Über organisch und anorganisch gebundene Phosphorsäure im Bier und ihre Beziehung zu Gerste und Malz.

Ludwig Adler.

Über organisch und anorganisch gebundene Phosphorsäure im Bier und ihre Beziehung zu Gerste und Malz

---

Von der

Kgl. Technischen Hochschule zu München

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Technischen Wissenschaften

(Doktor-Ingenieurs)

genehmigte Dissertation

ACAD. LANDBAU BIBL.

Vorgelegt von

Ludwig Adler, Dipl.-Ing.

aus München

Assistent an der Kgl. Technischen Hochschule in München

Referent: Prof. Dr. C. J. Lintner

Korreferent: Prof. Dr. A. Lipp

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Dezember 1911

München 1912

Druck von H. Kutzner, Rumfordstraße 32a

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555418_0040

Meinen lieben Eltern

gewidmet.

Vorliegende Arbeit wurde im gärungschemischen Laboratorium der Kgl. Technischen Hochschule zu München ausgeführt.

Es sei mir gestattet meinem hochverehrten Chef und Lehrer, Herrn Professor Dr. C. J. Lintner, unter dessen liebenswürdiger Leitung vorliegende Arbeit entstand, für seine stets bereitwillige Unterstützung meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Während die anorganischen Phosphate sowie die Gesamtphosphorsäure des Bieres schon des öfteren den Gegenstand eingehender Untersuchungen bildeten, ist auffallenderweise von der Möglichkeit einer in organischer Bindung vorhandenen Phosphorsäure nicht die Rede. Nur über Gersten- und Malzextrakte liegen solche Untersuchungen vor, deren Resultate aber in einigen wesentlichen Punkten von einander abweichen. So die Dissertation von L. Weiss „Beiträge zur Kenntnis der in Gerste und Malz vorkommenden Phosphorverbindungen", die Abhandlung von W. Windisch und W. Vogelsang in der Wochenschrift für Brauerei 1906, Nr. 40 und 41 „Über die Art der Phosphorsäureverbindungen in der Gerste und deren Veränderungen während des Weich-, Mälz-, Darr- und Maischprozesses", und die Arbeit von Stutzer in der biochemischen Zeitschrift, VII. Bd., S. 471. Von allen diesen Forschern wurde organisch gebundene Phosphorsäure in den Gersten- resp. Malzextrakten aufgefunden. Windisch-Vogelsang behaupten sogar, dass ursprünglich die Gerste nur organische Phosphorsäure enthalte. Andererseits glaubte man früher, in allen Pflanzensamen wäre der Phosphor in Form reiner anorganischer Salze vorhanden (Biolog, Zentralblatt 1896 Bd. XI Nr. 9 und 10, S. 270, O. Löw „Über die physiol. Funktionen der Phosphorsäure), bis von Posternak (Comtes rendus vol. CXXXVII. 1903, S. 202) in den Samen Lecithine, Nukleine, Nukleoproteide und Phytin nachgewiesen wurde. Weiss sowie Windisch zeigten dann, dass bei der wässerigen Extraktion von Gerste und Malz unter dem Einfluss von Enzymen hydrolytische Spaltungen auftreten und so aus den organischen Phosphorkomplexen die anorganische Phosphorsäure losgetrennt werde. Wie weit diese Zerlegung bei der Fertigstellung des Bieres geht, wie sich diese Verbindungen bei der Gärung verhalten, und ob überhaupt im Bier noch solche organische Phosphorsäuren vorhanden sind, darüber liegen keine Arbeiten vor. Und doch sind es gerade diese organischen Phosphorkomplexe, die ob ihrer leichten Assimilierbarkeit für den tierischen Organismus in der letzten Zeit Bedeutung erlangt haben.

Wir liessen es uns nun angelegen sein im Bier nach diesen organisch gebundenen Phosphorsäureverbindungen zu fahnden und überhaupt die Natur der darin vorhandenen Phosphorsäuren näher zu studieren. Dabei blieben die Untersuchungen nicht blos auf das fertige Produkt, das Bier, beschränkt, sondern befassten sich auch mit der Würze in den verschiedenen Stadien der Vergärung und Reife, sowie mit dem Ausgangsmaterial, der Gerste und dem Malz. Vor Inangriffnahme der Arbeit selbst suchte ich vor allem nach einem rasch ausführbaren und gleichwohl genauen Verfahren zur Phosphorsäurebestimmung und bemühte mich selbst ein solches auszuarbeiten.

Vorliegende Abhandlung ergibt dann folgende Einteilung:

I. Methodisches: 1. Kurze Angabe über die Phosphorsäurebestimmung nach v. Lorenz. 2. Modifikation der üblichen Urantitration von Phosphaten.

II. Das Bier: 1. Die Mengenverhältnisse der einzelnen Phosphorsäuren zu einander. 2. Die anorganischen Phosphate. 3. Die organischen Phosphorkomplexe.

III. Würze und Gärungen: 1. Voruntersuchungen über das Verhalten der Hefe zu Phosphorverbindungen bei der Gärung. 2. Das Verhältnis der anorganischen zur organischen Phosphorsäure in der Würze und die Veränderung bei der Gärung.

IV. Gersten- und Malzextrakte (Wurzelkeime): 1. Die unter verschiedenen Bedingungen extrahierten Gersten wurden auf die Natur der in Lösung gegangenen Phosphate untersucht. 2. Malz aus dieser Gerste ebenso behandelt. 3. Malzkeime.

I. Methoden zur quantitativen Bestimmung der Phosphorsäure.

Die Suche nach einer geeigneten Methode zur Phosphorsäurebestimmung war bald von Erfolg gekrönt. Für unseren Zweck schien das geeignetste Verfahren das von v. Lorenz (Landwirtschaftliche Versuchsstationen, 55, 1901, S. 183). Es wurde nachgeprüft und für vorzüglich befunden von Plücker (Zeitschrift für U. d. Nahrungs- und Genussmittel 1909 I., S. 446). Es gestaltet sich in grossen Zügen folgendermassen:

1. Phosphorsäure-Bestimmung nach v. Lorenz.

Die Methode beruht im Prinzip auf der Fällung der Phosphorsäure durch Sulfat-Molybdänreagens und Wägung des Niederschlages nach Behandlung mit Alkohol und Äther.

Ausführung der Bestimmung: In ein 250 cc Becherglas bringt man 30 cc pipettierte Aschelösung (erhalten durch Auflösen der Asche in wenig HNO_3 und Auffüllen mit Wasser auf 100 cc) und gibt 20 cc Salpeter-Schwefelsäure zu. Diese Mischung wird bis zum Erscheinen der ersten Kochblase erhitzt und vorsichtig in die Mitte der Lösung ein dünner Strahl des Sulfat-Molybdänreagens fliessen gelassen. Sobald sich die Hauptmenge des Niederschlages abgesetzt hat, rührt man mit einem Glasstabe um. Nachdem die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit klar geworden ist, filtriert man durch einen mit einem lufttrockenen und fettfreien Filtrierpapierscheibchen gewogenen Goochtiegel. Der Phosphormolybdänniederschlag wird im Tiegel gesammelt, viermal mit 2%iger Ammoniumnitratlösung ausgewaschen, dann mit Alkohol und Äther der Rest des Wassers entfernt. Bei zu langem Trockensaugen kann der Niederschlag hindurchgerissen werden. Man setzt darauf den Tiegel genau $^1/_2$ Stunde in einen luftverdünnten Raum, in welchem etwa 100—200 mm Druck herrschen und wiegt ihn sogleich. Das Gewicht der vorhandenen Ammoniummolybdänphosphat-Menge multipliziert mit 0,03295 ergibt den Gehalt an P_2O_5.

Herstellung der Reagenslösungen: 1. Man löst in einem reichlich 2 l fassenden Gefäss 100 g reines, trockenes $(NH_4)_2SO_4$ mit 1 l HNO_3 von s = 1,36 Ferner löst man 300 g reinstes Ammoniummolybdat in einem Liter Wasser und

giesst diese Lösung in dünnem Strahl unter Umrühren zur sulfathaltigen HNO_3. Man lässt nun mindestens 2 Tage bei Zimmertemperatur stehen, filtriert durch ein säurefestes Filter und bewahrt das fertige Reagens verschlossen im Kühlen und Dunkeln auf.

2. Schwefelsäurehaltige Salpetersäure. Man mischt 30 cc H_2SO_4 s = 1,84 mit 1 l HNO_3 s = 1,20.

3. 2%ige, wässrige Lösung von Ammoniumnitrat. Wenn die Lösung nicht schon sauer reagiert, ist sie mit einigen Tropfen HNO_3 pro Liter anzusäuern.

4. Alkohol von 96%. Er soll keinen Rückstand hinterlassen und nicht alkalisch reagieren.

5. Aether. Er soll rückstandfrei, nicht alkalisch reagieren und nicht zu wasserhaltig sein.

Diese Methode hat den Vorteil, dass wegen der Schwere des gebildeten Niederschlages, der nur $\frac{1}{33}$. an P_2O_5 enthält, eine grosse Genauigkeit erzielt werden kann. Als Nachteil wurde nur empfunden, dass die Ausführung einer Phosphorsäurebestimmung nach dieser Methode ziemliche Zeit in Anspruch nimmt. Deshalb war unser Streben darnach gerichtet eine andere Methode zu finden, die es gestattet schneller eine Analyse durchzuführen. Dazu schien am geeignetsten die Titrationsmethode mit Uranlösung, deren wunder Punkt aber darin besteht, dass für jede Konzentration der Phosphatlösung ein anderer Titer der Uranlösung bestimmt werden muss. Diesen Nachteil suchten wir zu beheben durch Modifikation der Titerstellung und einige andere Abänderungen.

2. Modifizierte Urantitration der Phosphorsäure.

Die massanalytische Bestimmung der Phosphorsäure und ihrer Salze, wie sie sich heute in den meisten Lehrbüchern vorfindet, wurde festgelegt von Pincus (Journ. für prakt. Chemie Bd. 76 S. 104). Er stützte sich auf die Arbeiten von Werther, A. Arendt und W. Knop (Chem. Zentralblatt 1856 769. 803 und 1857. 177), die zwecks gewichtsanalytischer Bestimmung der Phosphorsäure mit Uran die dabei entstehenden Verbindungen ermittelten. Später beschäftigten sich mit dieser Titrationsmethode besonders Abesser, Jani und Märker (Zeitschrift für analyt. Chemie 12. 254), wobei sie in erster Linie auf Superphosphatuntersuchungen ihr Augenmerk richteten.

Nach der Vorschrift von Pincus muss die zur Titerstellung benützte Lösung ungefähr dieselbe Konzentration besitzen als die zu untersuchende Phosphatlösung. Dies bildet einen grossen Uebelstand, da die Aschen der Cerealien, des Bieres, der Würze etc. in ihrem Gehalt an Phosphorsäure ziemlichen Schwankungen unterworfen sind. Bei der Untersuchung der Schärfe des Indikators bemerkten wir, dass erst ein gewisser Ueberschuss von Uranlösung imstande war eine Bräunung zu erzielen. Durch diesen notwendigen Zusatz von überschüssiger Uranlösung bis zur Ansprache der Tüpfelreaktion wird selbstverständlich das Resultat ungenau und für jede Konzentration eine neue Indexbestimmung notwendig, da das stets zugegebene Zuviel von Uranlösung in keinem Verhältnis steht zu dem wechselnden Gehalt an Phosphorsäure. Kennt man den Ueberschuss der Uranlösung, der erforderlich ist um mit dem Blutlaugensalz eine deutliche Farbenreaktion zu ergeben, und subtrahiert ihn sowohl bei der Titerstellung als auch bei jeder Analyse von der verbrauchten Menge Uranlösung, so erzielt man brauchbare Resultate und kommt mit einem Titer aus, der inner-

halb gewisser Grenzen für alle Konzentrationen gültig ist. Ausserdem müssen das Volumen der zu analysierenden Phosphatlösung sowie viele andere Bedingungen für alle Bestimmungen die gleichen bleiben. Auf Grundlage dieser Ueberlegung wurde die modifizierte Methode folgendermassen festgelegt.

1. Prinzip. Aus einer schwach essigsauren Phosphatlösung, die gleichzeitig Ammoniumsalze enthält, wird in der Hitze mit Uranylacetat ein Niederschlag von Uranylammoniumphosphat gefällt. Das Ende der Reaktion wird durch Tüpfeln mit Ferrocyankalium erkannt, mit dem ein gewisser Ueberschuss von Uranlösung eine braune Färbung erzeugt. Man schlägt den grössten Teil der Phosphorsäure in der Kälte nieder, erhitzt dann zum Kochen und vollendet die Titration in der Hitze.

2. Erforderliche Reagentien. a) Uranylacetatlösung. 35 g käufliches, krystallisiertes Uranylacetat wird zu 1 l mit Wasser gelöst und nach 2 Tagen filtriert. Der Titer bleibt dann konstant.

b) Natriumphosphatlösung. Man löst 7,6 g Natriumphosphat $Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$ zu 250 cc auf und bestimmt in 10 cc davon den genauen Gehalt an P_2O_5 durch eine Fällung nach v. Lorenz.

c) Ammoniumacetatlösung. 100 g reines Ammoniumacetat werden mit Wasser zu 1 l gelöst.

d) Eisessig — das käufliche Reagens.

e) Ferrocyankalium. Das gelbe Blutlaugensalz wird fein gepulvert und stets eine kleine, möglichst gleiche Menge davon in die Vertiefungen der Tüpfelplatte gebracht.

3. Ausführung der Bestimmung.

a) Titerstellung der Uranlösung. Es werden stets 3 Versuche ausgeführt, wie bei den Analysen selbst, und aus den erhaltenen Resultaten das Mittel gezogen. Man pipettiert 10 cc der Natriumphosphatlösung in ein Becherglas, das eine Marke bei 60 cc trägt, gibt 10 cc Ammoniumacetat hinzu und lässt aus einem Tropfglas 5—7 Tropfen Eisessig zufliessen. Dann füllt man bis zur Marke auf und lässt die Uranylacetatlösung aus einer Bürette eintropfen bis ein herausgenommener Tropfen mit dem auf der Tüpfelplatte befindlichen Indikator reagiert. Darauf wird zum Sieden erhitzt, wodurch ein Verschwinden der Braunfärbung mit dem Blutlaugensalz erzielt wird. Deshalb titriert man weiter und zwar so lange bis eine deutlich sichtbare Bräunung zu konstatieren ist. Da die allererste schwache Dunkelfärbung des Indikators viel zu unscharf ist, wird bis zum Auftreten eines deutlichen, aber noch schwachen rotbraunen Tones titriert und diese Farbennuance mittels Aquarellfarbe ein für allemal in einer Grube der Tüpfelplatte festgelegt Durch diese Arbeitsweise kann eine weit grössere Genauigkeit erzielt werden, da das Auge sonst zu starken Täuschungen ausgetzt ist. Die verbrauchte Menge Uranlösung wird abgelesen und notiert (J).

Um den Ueberschuss der Uranlösung, der zur Erzielung der festgelegten Farbentiefe zugegeben werden muss, zu bestimmen, führt man einen blinden Versuch aus. Man titriert heiss eine Mischung von 50 cc destilliertes Wasser mit 10 cc Ammoniumacetat und 5 Tropfen Eisessig bis zum Eintreten der festgelegten Färbung. Dazu sind meist 0,3—0,4 cc Uranlösung nötig. Der so erhaltene Wert wird mit C (Correction) bezeichnet und von allen Titrationen sowie von der bei der Titerstellung verbrauchten Menge Uranlösung abgezogen. Diese daraus sich ergebende Zahl, der wahre Index (Jw) genannt, liefert den wahren Titer (Tw), wenn man durch einfache Division die Anzahl Gramm P_2O_5 ermitttelt,

welche 1 cc Uranlösung entsprechen. Wird der Gehalt der 10 cc Phosphatlösung an P_2O_5 mit G bezeichnet, so ergeben sich folgende Gleichungen;

$$Tw = \frac{G}{Jw}; \quad Jw = J - C.$$

Dabei wird G in Gramm, alle anderen Werte in CC bestimmt. Die beiden Zahlen Tw und C sind für jede Uranlösung charakteristisch.

b. Bestimmung der Phosphorsäure in Aschen. Die Anwendung der Urantitrationsmethode zu Aschenanalysen ist nicht neu. Nach unserer Abänderung gestaltet sie sich in dieser Weise Die aus Gerste, Malz, Bier, Würze und ähnlichen Substanzen erhaltenen Aschen werden in möglichst wenig verdünnter Salpetersäure gelöst, in ein Becherglas gespült und mit Ammoniak ganz schwach übersättigt. Soda hierzu zu verwenden ist nicht ratsam, da Uranacetat mit Natriumcarbonat eine lösliche komplexe Verbindung eingeht, die mit Ferrocyankalium keine Farbenreaktion mehr gibt. Die ganz schwach ammoniakalische, meist etwas trübe Lösung wird mit Eisessig versetzt bis sie vollkommen klar geworden ist, was sich durch Erhitzen beschleunigen lässt. Dann erst gibt man 5 Tropfen Eisessig und 10 cc Ammoniumacetatlösung zu, füllt zu 60 cc auf, titriert in der Kälte, dann in der Hitze bis zum Eintreten der festgelegten Farbenreaktion, zieht von der verbrauchten Menge Uranlösung die Correction (C) ab und berechnet daraus den Gehalt der Asche an P_2O_5. Sollte die Asche zu reich an P_2O_5 sein, so verwende man nur einen Teil der Aschelösung zur Analyse, was man durch geeignete Verdünnung im Messkölbchen mit Leichtigkeit erreichen kann. Die Konzentration der zu titrierenden Flüssigkeiten soll stets 0,02—0,20 g P_2O_5 in 60 cc der Lösung betragen. Erwähnt mag noch werden, dass die Aschen nicht zu viel Eisen oder Aluminium, was an und für sich kaum in Betracht kommt, enthalten dürfen, weil die Phosphate dieser Metalle in Essigsäure unlöslich sind.

c. Bestimmung der anorganischen neben organischen Phosphorverbindungen. Diese Urantitration gestattet es auch durch, wie wir sie nennen wollen, „direkte Titration“ anorganische neben organischen Phosphaten zu bestimmen, was, wie wir später sehen werden, sonst auf einem langwierigeren Wege geschehen muss. Anwendung findet diese Methode besonders bei Bier, Würze, Gerste-, Malz- und Wurzelkeimextrakten und wird wie die anderen Titrationen ausgeführt. Man pipettiert 50 cc der Lösung, neutralisiert eventuell mit Ammoniak, gibt Eisessig und Ammoniumacetat hinzu und titriert bei einem Volumen von 60 cc. Die dunkle Farbe der zu analysierenden Lösungen ist bei einiger Übung zur Erkennung des Endpunktes der Reaktion nicht hinderlich. Nur die Umsetzung zwischen Uranlösung und Phosphorsäure erfolgt hier ziemlich träge, wenigstens in der Kälte, so dass meist schon nach Zugabe von 10% der nötigen Uranmenge der Indikator stark und deutlich anspricht; diese Färbung verschwindet aber nach 5—10 Minuten wieder vollkommen auf der Tüpfelplatte. Besser erhitzt man die phosphorhaltige Flüssigkeit vor Beginn der Titration zum Kochen. Bei der Kontrollanalyse lässt man sofort etwas weniger als die vorher verbrauchte Uranmenge zufliessen, kocht auf und titriert fertig. Auf diese Weise erhält man gute Resultate.

Mit dieser Methode wurden nun zuerst mehrere Probeanalysen mit reinen Phospatlösungen ausgeführt, um uns von ihrer Genauigkeit zu überzeugen. Man verwendete dabei 2 verschiedene Uranlösungen, deren Stärke eine Kleinigkeit differierte.

Beispiele.

1. Beweise für die Richtigkeit der veränderten Titerstellung.

Es wurden Lösungen von steigendem Gehalt an Phosphorsäure der Titration unterworfen. Diese Lösungen stellten wir uns her, indem wir von der erwähnten Natriumphosphatlösung wachsende Mengen aus einer Bürette entnahmen. Man titrierte wie üblich unter Zugabe von Ammoniumacetat und Eisessig bei einem Volumen von 60 cc. Aus je 3 Analysen vereinigte man die Mittelwerte in einer Tabelle. Genau 10 cc der Phosphatlösung dienten zur Titerstellung und zur Grundlage für die aus den verdünnteren oder konzentrierteren Lösungen erhaltenen Werte.

a. Versuch. C = **0,37** cc

10 cc Phosphatlösung entsprechen 0,0648 gr P_2O_5 = G.
Zur Titeration wurden verbraucht an Uranlösung 12,24 cc = J.

$$Jw = J - C = 12{,}24 - 0{,}37 = 11{,}87.$$

$$Tw = \frac{G}{Jw} = \frac{0{,}0648}{11{,}87} = \mathbf{0{,}00546.}$$

Diese Zahl gibt an, wie viele Gramm P_2O_5 in Wahrheit 1 cc unserer Uranlösung entsprechen. Die Resultate der Titration sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Phosphatlösung		cc Uranlösung			Differenz der korrig. von der theor. Menge in cc
cc	g P_2O_5	Wirklich verbraucht	Nach Abzug von C. korrigiert	Theoretisch notwendig	
0,00	0,00	0,37	0,00	0,00	± 0,00
2,50	0,0162	3.36	2,99	2,97	+ 0,02
5,00	0,0324	6,27	5,90	5,94	− 0,03
7,50	0,0486	9,28	8,91	8,91	± 0,00
10,00	0,0648	12,24	11,87	11,87	± 0,00
12,50	0,0810	15,17	14,80	14,84	+ 0,04
15,00	0,0972	18,12	17,75	17,81	− 0,06
17,50	0,1134	21,20	20,83	20,78	+ 0,05.

Mit einer anderen Uran- sowie Phosphatlösung wurde derselbe Versuch wiederholt.

b. Versuch. C = **0,30** cc

10 cc Phosphatlösung entsprechen 0,0644 gr P_2O_5 = G.
Zur Titration wurden verbraucht an Uranlösung 11,40 cc = J.

$$Jw = J - C = 11{,}40 - 0{,}30 = 11{,}10.$$

$$Tw = \frac{G}{Jw} = \frac{0{,}0644}{11{,}10} = \mathbf{0{,}0058.}$$

Die Resultate ergeben sich aus folgender Tabelle:

Phosphatlösung		cc Uranlösung			Differenz der korrig. von der theor. Menge in cc
cc	g P_2O_5	Wirklich verbraucht	Nach Abzug von C. korrigiert	Theoretisch notwendig	
0,00	0,00	0,30	0,00	0,00	± 0,00
2,50	0,0161	3,04	2,74	2,77	− 0,03
5,00	0,0322	5,88	5,58	5,55	+ 0,03
7,50	0,0483	8,60	8,30	8,32	− 0,02
10,00	0,0644	11,40	11,10	11,10	± 0,00
12,50	0,0805	14,13	13,83	13,87	− 0,04
15,00	0,0966	16,89	16,59	16,65	− 0,06
17,50	0,0127	19,73	19,43	19,42	+ 0,01
20,00	0,1288	22,45	22,15	22,20	− 0,05
30,00	0,1932	33,68	33,68	33,30	+ 0,08

Durch diese Analysen wird ersichtlich, dass sich nach dieser Methode gute Ergebnisse erzielen lassen. Eine absolute Genauigkeit aber ist bei massanalytischen Bestimmungen selten zu erreichen.

2. Ausführung verschiedener Aschebestimmmungen, sowie Analysen von phosphorhaltigen Niederschlägen.

Die Analysenresultate von einigen Aschen (die Veraschung geschah nach einer später erwähnten Methode) sollen hier angegeben werden. Da meist von jeder Sorte nur eine Titration ausgeführt werden konnte, da man den Rest zur Vergleichsbestimmung nach v. Lorenz verwendete, so sind die Ergebnisse nicht immer als einwandfrei zu bezeichnen. Die mit Magnesiamixtur im Bier erzeugten Niederschläge der anorganischen Phosphate wurden nach dem Glühen vor dem Gebläse ebenso wie die Aschen weiter behandelt und das Resultat der Titration dem der Lorenzfällung gegenübergestellt.

a. Gerstenasche. C = 0,21. Tw = 0,005379.

0,1182 g Asche verbrauchten 7,42 cc Uranlösung
− 0,21 „ „
7,21 cc Uranlösung = 0,0388 g P_2O_5, so dass die Asche **32,81** % P_2O_5 enthält. Die Lorenzfällung ergab 33,31 % P_2O_5.

b. Asche eines dunklen Bieres. Verwendet wurde hier und bei den folgenden Untersuchungen stets die gleiche Uranlösung. Die Asche von 50 cc Bier verbrauchte an Uranlösung: 7,18 cc resp. 7,22 cc
− 0,21 „ − 0,21 „
6,97 cc 7,01 cc

Als Mittel ergibt sich 6,99 cc = **0,0752** % P_2O_5 in 100 cc Bier. Die Lorenzfällung ergab 0,0754 % P_2O_5.

c. Asche eines dunklen Bieres. Die Asche von 50 cc Bier verbrauchte:

7,96 cc Uranlösung
— 0,21 „
7,75 cc Uranlösung = **0,0834** % P_2O_5 in 100 cc Bier. Die Lorenzfällung ergab 0,0826 % P_2O_5.

d. Asche eines dunklen Bieres. Die Asche von 50 cc Bier verbrauchte:

8,40 cc Uranlösung
— 0,21 „
8,19 cc Uranlösung = **0,0881** % P_2O_5 in 100 cc Bier. Die Lorzenzfällung ergab 0,0876 % P_2O_5.

e. Asche eines dunklen Bieres. Die Asche von 50 cc Bier verbrauchte:

6,71 cc Uranlösung
— 0,21 „
6,50 cc Uranlösung = **0,0699** % P_2O_5 in 100 cc Bier. Die Lorenzfällung ergab 0,0708 % P_2O_5.

f. Asche eines Starkbieres. Die Asche von 50 cc Bier verbrauchte an Uranlösung: 11,26 cc resp. 11,23 cc
— 0,21 „ — 0,21 „
11,05 cc 11,02 cc

Als Mittel ergibt sich 11,03 cc = **0,1188** % P_2O_5 in 100 cc Bier. Die Lorenzfällung ergab 0,1209 % P_2O_5.

g. Magnesiamixturniederschlag aus einem hellen Bier. Der Niederschlag aus 50 cc Bier verbrauchte:

5,91 cc Uranlösung
— 0,21 „ „
5,70 cc Uranlösung = **0,0628** % P_2O_5 in 100 cc Bier. Die Lorenzfällung ergab 0,0643 % P_2O_5.

h. Magnesiamixturniederschlag aus einem hellen Bier. Der Niederschlag aus 50 cc Bier verbrauchte:

5,53 cc Uranlösung
— 0,21 „
5,32 cc Uranlösung = **0,0573** % P_2O_5 in 100 cc Bier. Die Lorenzfällung ergab 0,0587 % P_2O_5.

i. Gerstenasche. C = 0,30; Tw = 0,0058.

0,1591 g Asche verbrauchten 5,47 cc Uranlösung
— 0,30 „
5,17 cc Uranlösung = 0,6222 g P_2O_5, so dass die Asche **39,10** % P_2O_5 enthält. Die Lorenzfällung ergab 39,79 % P_2O_5.

k. Asche von Malzkeimen. C = 0,30; Tw = 0,0058.

0,3768 g Asche verbrauchten 9,20 cc Uranlösung
— 0,30 „
8,90 cc Uranlösung = 1,032 g P_2O_5, so dass die Asche **27,39** % P_2O_5 enthält. Die Lorenzfällung ergab 28,34 % P_2O_5.

3. „Direkte Titrationen" von anorganischer Phosphorsäure.

Betreff der Schärfe dieser Bestimmung ist zu erwähnen, dass sie sehr von dem zu untersuchenden Material abhängt. Während Bier und Würze stets brauchbare Resultate liefern, stimmt die Urantitration bei Gerstenextrakten sowie auch manchmal bei Malzextrakten mit der Magnesiamixturfällung nicht überein. Worin der

Grund dieser Tatsache zu suchen ist, darüber konnte ich mir nicht Klarheit verschaffen. Es folgen hier einige Analysen, die die Werte der anorganischen Phosphate in den betreffenden Substanzen repräsentieren.

a. Helles Bier. C = 0,21; Tw = 0,005379. 50 cc Bier verbrauchten an Uranlösung:

4,49 cc		resp.	4,53 cc
— 0,21 „			— 0,21 „
4,28 cc			4,32 cc

Als Mittel ergibt sich 4,30 cc = **0,0462** % anorg. P_2O_5 in 100 cc Bier. Die Fällung mit Magnesiamixtur, die, wie später erwähnt wird, ausgeführt wurde, ergab 0,0471 % P_2O_5.

b. Dunkles Bier. C und Tw wie oben. 50 cc Bier verbrauchten an Uranlösung:

5,83 cc		resp.	5,76 cc
— 0,21 „			— 0,21 „
5,62 cc			5,55 cc

Als Mittel ergibt sich 5,59 cc = **0,0601** % anorg. P_2O_5 in 100 cc Bier. Die Magnesiafällung ergab 0,0579 % P_2O_5.

c. Dunkles Bier. 50 cc Bier verbrauchten an Uranlösung:

6,71 cc		resp.	6,77 cc
— 0,21 „			— 0,21 „
6.50 cc			6,56 cc

Als Mittel ergibt sich 6,53 cc = **0,0702** % anorg. P_2O_5 in 100 cc Bier. Die Magnesiafällung ergab 0,0684 % P_2O_5.

d. Dunkles Bier. 50 cc Bier verbrauchten an Uranlösung:

6,95 cc		resp.	7,01 cc
— 0,21 „			— 0,21 „
6,74 cc			6,80 cc

Als Mittel ergibt sich 6,77 cc = **0,0728** % anorg. P_2O_5 in 100 cc Bier. Die Magnesiafällung ergab 0,0711 % P_2O_5.

e. Dunkles Bier. 50 cc Bier verbrauchten an Uranlösung:

6,10 cc		resp.	6,03 cc
— 0,21 „			— 0,21 „
5,89 cc			5,82 cc

Als Mittel ergibt sich 5,85 cc = **0,0630** % anorg. P_2O_5 in 100 cc Bier. Die Magnesiafällung ergab 0,0620 % P_2O_5.

f. Starkbier. 50 cc Bier verbrauchten an Uranlösung:

9,64 cc		resp.	9,58 cc
— 0,21 „			— 0,21 „
9,43 cc			9,37 cc

Als Mittel ergibt sich 9,40 cc = **0,1011** % anorg. P_2O_5 in 100 cc Bier. Die Magnesiafällung ergab 0,0998 % P_2O_5.

g. Würze fast zu Ende vergoren C = 0,30; Tw = 0,0058.

50 cc verbrauchten 6,31 cc Uranlösung
— 0,30 „
6,01 cc Uranlösung = **0,0696** % anorg. P_2O_5 in 100 cc Würze. Die Magnesiafällung ergab 0,0684 % P_2O_5.

h. Laboratoriummaische aus dunklem Malz. C und Tw wie bei g.

50 cc verbrauchten 5,22 cc Uranlösung
— 0,30 „
4,92 cc Uranlösung = **0,0570** % anorg. P_2O_5 in 100 cc der Maische. Die Magnesiafällung ergab 0,0580 % P_2O_5.

i. Malzkeimextrakt mit Wasser. (1 : 20).

50 cc verbrauchten 7,72 cc Uranlösung
— 0,30 „
7,42 cc Uranlösung = **0,0860** % anorg. P_2O_5 in 100 cc des Extraktes. Die Magnesiafällung ergab 0,0808 % P_2O_5.

k. Malzkeimextrakt mit 1 % konz. HCl-Lösung. (1 : 20).

50 cc verbrauchten 4,80 cc Uranlösung
— 0,30 „
4,50 cc Uranlösung = **0,0522** % anorg. P_2O_5 in 100 cc des Extraktes. Die Magnesiafällung ergab 0,0508 % P_2O_5.

l. Malzkeimextrakt mit Wasser (1 : 20) nach vorheriger Behandlung mit Alkohol.

50 cc verbrauchten 5,32 cc Uranlösung
— 0,30 „
5,02 cc Uranlösung = **0,0582** % anorg. P_2O_5 in 100 cc des Extraktes. Die Magnesiafällung ergab 0,0550 % P_2O_5.

m. Gerstenextrakt mit Wasser. (1 : 10).

50 cc verbrauchten 5,50 cc Uranlösung
— 0,30 „
5,20 cc Uranlösung = **0,0604** % anorg P_2O_5 in 100 cc des Extraktes. Die Magnesiafällung ergab 0,0588 % P_2O_5

Ausserdem wurden noch analysiert Gerstenextrakte mit 1 % konz. HCl-Lösung, Gerstenextrakte mit Wasser nach Behandlung mit Alkohol, Malzextrakte ebenso hergestellt und einfache Malzextrakte mit Wasser, die alle auf 100 cc der Lösung berechnet eine Differenz mit der Magnesiafällung ergaben von 6—15 mg P_2O_5.

Aus den angeführten Beispielen ersieht man, dass man sich auf die Resultate der „direkten Titration“ bei Bier und Würze recht gut verlassen kann. Bei den späteren analytischen Untersuchungen wurde sie aber nicht angewandt, da es dabei auf die grösstmöglichste Genauigkeit ankam, die nur durch die Lorenzmethode gewährleistet wird. Alles in allem genommen hoffe ich durch die Versuche gezeigt zu haben, dass die Urantitration durch die angewandte Modifikation an Exaktheit gewonnen hat.

II. Untersuchungen über die anorganischen und organischen Phosphate im Bier.

In erster Linie bildete es unsere Aufgabe einen Weg zu finden die anorganischen von den organischen Phosphorverbindungen zu trennen, um überhaupt ein Vorhandensein der letzteren nachweisen zu können. Das Nächstliegendste war sich auch hier der Magnesiamixtur zu bedienen, die L. Weiss (l. c.) bei der Bestimmung der organischen Phosphate in Gersten- und Malzextrakten gute Dienste geleistet hatte. Er zeigt, dass durch dieses Fällungsmittel auch aus Lösungen, welche viel organische Substanz enthalten, die anorganischen Phosphate quantitativ niedergeschlagen werden, während die organischen Phosphorverbindungen gelöst bleiben. Experimentell bewies er dies, indem er zu Mischungen von Rohrzucker- und Achroodextrinlösungen (4 %) eine genau bekannte Phosphatmenge zusetzte, die er durch Magnesiamixtur wieder vollständig abzuscheiden vermochte. Einen ähnlichen Versuch führte auch ich aus. Ein

Bier, das durch Magnesiamixtur von allen organischen Phosphaten befreit worden war, erhielt die gleiche Menge Phosphor in Form einer Lösung von $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ zugesetzt und zwar genau 0,0803 g P_2O_5 auf 100 cc Bier.

Bei 2 Versuchen wurde zurückgewonnen: 1. 0,0805 g P_2O_5
2. 0,0807 g P_2O_5.

Durch die organischen Substanzen des Bieres (Zucker, Dextrin, Eiweiss) wird also keine Spur von anorganischen Phosphaten bei der Fällung zurückgehalten. So ist uns durch die Magnesiamixtur ein Mittel in die Hand gegeben, die anorganische von der organischen Phosphorsäure zu scheiden. Sollte deshalb die aus einer bestimmten Menge Bier aus der Asche gewonnene Phosphorsäure die durch Magnesiamixturfällung aus derselben Quantität erhaltene Phosphorsäure an Gewicht übertreffen, so kann mit gutem Grund von organischen Phosporverbindungen die Rede sein. Und tatsächlich liegen beim Bier die Verhältnisse so.

Die Ausscheidung der anorganischen Phosphate aus dem Bier geschieht auf einfache Weise. Die Fällungen mit Magnesiamixtur in ammoniakalischer Lösung wird stets in der Kälte vorgenommen und der Niederschlag bis zum vollständigen Absitzen stehen gelassen. Da er oft ziemlich langsam filtriert, soll er möglichst spät auf das Filter gebracht werden. Der bei 100° getrocknete Niederschlag wird vor dem Gebläse geglüht und die Asche wie bei der Lorenzbestimmung weiterbehandelt, indem man ihn mit der Mischung von Salpeter-Schwefelsäure erhitzt, einige Minuten stehen lässt, damit sich das entstandene Pyrophosphat vollständig in Orthophosphat zurückverwandeln kann und das Filtrat mit der vorgeschriebenen Molybdänlösung versetzt.

Um auch in die Natur der anorganischen Phosphate einen Einblick zu bekommen, wird die Fällung in 2 Stadien ausgeführt und zwar zuerst durch Ammoniak die an Erdalkalien ([Ca] Mg) gebundene Phosphorsäure und dann im Filtrat davon durch Magnesiamixtur der Rest als an Alkalien ([Na]K) gebunden abgeschieden Der Ammoniak-Niederschlag wird ebenso wie der Magnesiamixturniederschlag nach v. Lorenz weiter bestimmt. Natürlich ist es auch möglich das Veraschen der Ammoniak- und Mixturfällung zu umgehen, indem man direkt mit der warmen, verdünnten Salpeter-Schwefelsäuremischung vom Filter löst. Allerdings ist dann die Lösung des Mixturniederschlages gelb gefärbt, was aber für die Resultate belanglos bleibt.

a. Durch Veraschen des Ammoniakniederschlages ergab sich 0,0305 g P_2O_5. Durch Lösen vom Filter ergab sich 0,0309 g P_2O_5.

b. Durch Veraschen des Mixturniederschlages ergab sich 0,0541 g P_2O_5. Durch Lösen vom Filter ergab sich 0,0538 g P_2O_5.

Ausserdem ist es auch gleichgiltig, ob man mit Magnesiamixtur die gesamtanorganische Phosphorsäure ausfällt und daraus die alkaliengebundene durch Subtraktion der mit Ammoniak in einer zweiten Probe gefällten berechnet oder ob man beide für sich experimentell bestimmt und durch Addition der beiden Werte die gesamtanorganische erhält.

Ähnlich verhält es sich auch bei der organischen Phosphorsäure Es gibt auch hier zwei Wege ihre Menge zu bestimmen. Entweder verascht man das Filtrat der Mixturfällung und ermittelt die darin vorhandene Phosphorsäure oder man berechnet sie durch Subtraktion der gesamtanorganischen von der gesamten Phosphorsäure im Bier. Eine Fällungsmethode der organischen Phosphate steht

leider nicht zur Verfügung; man kann sie höchstens nach starker Hydrolyse mit Säuren, wovon später noch die Rede sein wird, in anorganischer Form mit Magnesiamixtur niederschlagen.

Zuletzt sei erwähnt, dass auch die Gesamtphosphorsäure auf einem direkten Weg — durch Veraschen — oder einem indirekten bestimmt werden kann, indem durch Addition des Phosphorgehaltes der Mixturfällung resp. der Summe der Alkalien- und Erdalkalienphosphorsäure zur organischen Phosphorsäure jene resultieren muss.

Der Beweis für die letzten zwei Punkte ist leicht zu erbringen.

Bei der Analyse eines Bieres betrug die Gesamtphosphorsäure 0,0802 g P_2O_5, die gesamtanorganische 0,0664 g P_2O_5.

Das Filtrat der Ammoniakfällung, welche als Erdalkalienphosphorsäure 0,0298 g P_2O_5 = 37,16 % der gesamten P_2O_5 = 44,88 % der gesamten anorganischen P_2O_5 ergab, wurde mit Magnesiamixtur versetzt und in dem neu entstandenen Niederschlag die Phosphorsäure bestimmt. Es ergab sich als Alkalienphosphorsäure 0,0367 % P_2O_5 = 45,76 % der gesamten P_2O_5 = 55,27 % der gesamtanorganischen P_2O_5.

Das Filtrat der Mixturfällung wurde nun noch verascht und darin der Rest der Phosphorsäure ermittelt. Dabei ergab sich als organische Phosphorsäure 0,0142 g P_2O_5 = 17,71 % der gesamten P_2O_5.

Ausserdem wurden die Werte für alkalieugebundene, gesamtanorganische, organische und gesamte Phosphorsäure auch noch rechnerisch ermittelt durch Addition, Subtraktion und ähnliche Manipulationen, wie vorher angegeben, und die so erhaltenen Werte mit obigen experimentell ermittelten in einer Tabelle zusammengestellt.

Art der Phosphorsäure	Gramm P_2O_5		Prozent P_2O_5	
	berechnet	experimentell ermittelt	berechnet	experimentell ermittelt
alkaliengebunden	0,0364	0,0367	45,39	45,76
gesamtanorganisch	0,0665	0,0664	82,92	82,80
organisch	0,0138	0,0142	17,21	17,71
gesamt	0,0807	0,0802	100,63	100,00

Es zeigt sich, dass die sowohl nach der einen wie nach der andern Methode gewonnenen Resultate fast vollständig übereinstimmen. Deshalb wird auch bei den folgenden Untersuchungen stets so vorgegangen werden, wie es die gegebenen Umstände erfordern.

1. Die quantitativen Verhältnisse der einzelnen Phosphate im Bier.

Verschiedene Sorten Münchener Bier wurden analysiert, wobei anfangs je 3 Proben einer Art zur Untersuchung gelangten um zu zeigen, dass unter gleichen Bedingungen in ein und demselben Bier durch Ammoniak resp. Magnesiamixtur die gleiche Menge Phosphorsäure gefällt wird.

Dunkles Bier.

1. Gesamtphosphorsäure. Zur Bestimmung der Gesamtphosphorsäure wurden zweimal je 50 cc Bier unter Zusatz von MgO und einigen Tropfen verdünnter HCl zur Trockene gebracht und verascht. Durch die zugesetzte Säure vermindert sich das lästige Steigen der Substanz beim Veraschen, während durch das Magnesiumoxyd eine Verflüchtigung der Phosphorsäure in Form von Phosphor verhindert und eine reinweisse Asche erzielt wird. Die Phosphorsäurebestimmung wurde nach v. Lorenz ausgeführt. Die Resultate sind durch Verdoppelung auf 100 cc Bier berechnet.

1. Probe ergab 0,0801 g P_2O_5 = 0,0801 % P_2O_5 in 100 cc Bier
2. Probe „ 0,0803 g P_2O_5 = 0,0803 % P_2O_5 „ „ „ „

Als Mittel berechnet sich 0,0802 g P_2O_5 = **0,0802** % P_2O_5 in 100 cc Bier; oder auf Gewichtsprozente umgerechnet, da das spez. Gewicht des Bieres 1,0163 war, = **0,0815** % P_2O_5 in 100 g Bier. Der wirkliche Extraktgehalt (e) wurde zu 5,62 % Balling gefunden, woraus sich ergibt **1,45** % P_2O_5 im Extrakt.

2. Erdalkalienphosphorsäure. Dreimal 100 cc Bier wurden mit der Pipette abgemessen und mit Ammoniak versetzt. Es fielen die an Kalk und Magnesia gebundenen Phosphate aus. Im veraschten und geglühten Niederschlag wurde die Phosphorsäure nach v. Lorenz bestimmt.

1. Probe ergab 0,0300 g P_2O_5 = 37,41 % der ges. P_2O_5 = 45,18 % der anorg. P_2O_5
2. Probe „ 0,0302 g P_2O_5 = 37,66 % „ „ P_2O_5 = 45,48 % „ „ P_2O_5
3. Probe „ 0,0298 g P_2O_5 = 37,16 % „ „ P_2O_5 = 44,88 % „ „ P_2O_5

Als Mittel berechnet sich daraus 0,0300 g P_2O_5 = **37,41** % der ges. P_2O_5 = **45,18** % der anorg. P_2O_5. Die Werte in Prozent der anorganischen Phosphorsäure wurden erhalten unter Zugrundelegung der Phosphorsäuremenge, die sich durch Magnesiamixtur fällen liess.

3. Gesamtanorganische Phosphorsäure. Es wurden wiederum 3 neue Mengen Bier von je 100 cc zur Analyse verwendet Die mit Ammoniak und Magnesiamixtur erzielten Niederschläge ergaben folgende Resultate.

1. Probe enthielt 0,0662 g P_2O_5 = 82,55 % der ges. P_2O_5.
2. Probe „ 0,0659 g P_2O_5 = 82,17 % „ „ P_2O_5.
3. Probe „ 0,0671 g P_2O_5 = 83,67 % „ „ P_2O_5.

Als Mittel berechnet sich daraus 0,0664 g P_2O_5 = **82,80** % der ges. P_2O_5.

4. Alkalienphosphorsäure. Diese Zahlen erhielt man durch Berechnung, indem man von der gesamtorganischen Phosphorsäure die Phosphorsäure subtrahierte, die schon durch Ammoniak allein ausgefällt war, wobei man mit dem Mittelwert operierte. Es ergibt sich so 0,0364 g P_2O_5 = **45,39** % der ges. P_2O_5 = **54,82** der anorg. P_2O_5.

5. Organische Phosphorsäure. Auch diese Zahlen mussten rechnerisch ermittelt werden durch Subtraktion der anorganischen von der gesamten Phosphorsäure. Es ergibt sich 0,0138 g P_2O_5 = **17,21** % der ges. P_2O_5.

6. Verhältnis der anorganischen zur organischen Phosphorsäure. Durch Berechnung dieses einfachen Verhältnisses erhalten wir einen Wert, der uns beim Vergleich der einzelnen Biersorten gute Dienste leistet, da er eine schnelle Übersicht ermöglicht. Wir nennen ihn $V\frac{a}{o}$ (Verhältnis anorg. : org. Posphorsäure). Er berechnet sich in unserem Falle nach dem Ansatz $V\frac{a}{o} = \frac{0{,}0664}{0{,}0138} = \mathbf{4{,}812}$.

Helles Bier.

Die Untersuchungen wurden hier und bei den folgenden Analysen wie bei dem eben angeführten Beispiel angestellt.

1. Gesamtphosphorsäure. Zweimal je 50 cc Bier mit MgO und HCl verascht enthielten an Phosphorsäure:

1. Probe 0,0642 g P_2O_5 = 0,0642 % P_2O_5 in 100 cc Bier.
2. Probe 0,0639 g P_2O_5 = 0,0639 % P_2O_5 „ „ „ „

Als Mittel ergibt sich daraus 0,0641 g P_2O_5 = **0,0641** % P_2O_5 in 100 cc Bier; oder in Gewichtsprozenten **0,0649** % P_2O_5 in 100 g Bier, da das spez. Gewicht des verwendeten Bieres 1,0133 betrug. Der wirkliche Extrakt wurde zu 5,11 % gefunden, woraus sich berechnet **1,27** % P_2O_5 im Extrakt.

2. Erdalkalienphosphorsäure. Zweimal je 100 cc Bier wurden mit Ammoniak versetzt.

1. Probe ergab 0,0298 g P_2O_5 = 46,49 % der ges. P_2O_5 = 54,88 % der ges. anorg. P_2O_5.
2. Probe „ 0,0304 g P_2O_5 = 47,42 % „ „ P_2O_5 = 55,98 % „ „ „ P_2O_5.

Als Mittel berechnet sich daraus 0,0301 g P_2O_5 = **46,96** % der ges. P_2O_5 = **55,43** % der ges. anorg. P_2O_5.

3. Gesamtanorganische Phosphorsäure. Zwei neue Mengen wurden mit Magnesiamixtur gefällt.

1. Probe ergab 0,0544 g P_2O_5 = 84,87 % der ges. P_2O_5.
2. Probe „ 0,0542 g P_2O_5 = 84,56 % „ „ P_2O_5.

Als Mittel berechnet sich daraus 0,0543 g P_2O_5 = **84,71** % der ges. P_2O_5.

4. Alkalienphosphorsäure. Diese Zahlen sind durch Rechnung ermittelt. Es ergibt sich 0,0242 g P_2O_5 = **37,75** % der ges. P_2O_5 = **44,57** % der anorg. P_2O_5.

5. Organische Phosphorsäure. Ebenfalls durch Berechnung erhalten. 0,0098 g P_2O_5 = **15,29** % der ges. P_2O_5.

6. Verhältnis der anorganischen zur organischen Phosphorsäure

Wie früher berechnet ergibt sich $V\frac{a}{o}$ = **5,541.**

Starkbier.

Es wurde von nun an stets nur je eine Analyse ausgeführt.

1. Gesamtphosphorsäure. Durch Veraschen ergab sich 0,0996 g P_2O_5 = **0,0996** % P_2O_5 in 100 cc Bier.

2. Erdalkalienphosphorsäure. Durch Ammoniak erhielt man aus 100 cc Substanz 0,0364 g P_2O_5 = **36,55** % der ges. P_2O_5 = **44,28** % der anorg. P_2O_5.

3. Gesamtanorganische Phosphorsäure. Durch Magnesiamixtur wurden aus 100 cc gefällt 0,0822 g P_2O_5 = **82,53** % der ges P_2O_5.

4. Alkalienphosphorsäure. Durch Berechnung wie früher erhalten. 0,0458 g P_2O_5 = **45,98** % der ges. P_2O_5 = **55,72** % der anorg. P_2O_5.

5. Organische Phosphorsäure durch Rechnung. 0,0174 g P_2O_5 = **17,47** % der ges. P_2O_5.

6. Verhältnis der anorganischen zur organischen Phosphorsäure

$V\frac{a}{o}$ = **4,724.**

Dunkles Exportbier.

Zuletzt kam noch ein pasteurisiertes Bier zur Untersuchung.

1. Gesamtphosphorsäure. Durch Veraschen ergab sich 0,0754 g P_2O_5 = **0,0754** % P_2O_5 in 100 cc Bier.

2. Erdalkalienphosphorsäure. Durch Ammoniak ausgefällt. 0,0323 g P_2O_5 = **42,48** % der ges. P_2O_5 = **55,40** % der anorg. P_2O_5.

3. Gesamtanorganische Phosphorsäure. Durch Magnesiamixtur gefällt. 0,0583 g P_2O_5 = **77,32 %** der ges. P_2O_5.

4. Alkalienphosphorsäure. Durch Rechnung. 0,0260 g P_2O_5 = **34,48 %** der ges. P_2O_5 = **44,60 %** der anorg. P_2O_5.

5. Organische Phosphorsäure. Durch Rechnung. 0,0171 g P_2O_5 = **22,68 %** der ges. P_2O_5.

6. Verhältnis der anorganischen zur organischen Phosphorsäure. $V\frac{a}{o}$ = **3,409.**

Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse in folgender Tabelle zusammengestellt.

Art des Bieres	Gesamtphosphorsäure			In Prozent der Gesamtphosphorsäure				$V\frac{a}{o}$	In Pzt. der anorg. Phosphorsäure	
	in 100 cc	in 100 g	im Extrakt (e)	anorg. P_2O_5	organ. P_2O_5	Erdalkal.-P_2O_5	Alkalien-P_2O_5		Erdalkal.-P_2O_5	Alkalien-P_2O_5
DunklesBier	—	—	—	0,0664 g	0,0138 g	0,0300 g	0,0364 g	4,812	0,0300 g	0,0364 g
	0,0802 %	0,0815 %	1,45 %	**82,80 %**	**17,21 %**	**37,41 %**	**45,39 %**		**45,18 %**	**54,82 %**
Helles Bier	—	—	—	0,0543 g	0,0098 g	0,0301 g	0,0242 g	5,541	0,0301 g	0,0242 g
	0,0641 %	0,0649 %	1,27 %	**84,71 %**	**15,29 %**	**46,96 %**	**37,75 %**		**55,43 %**	**44,57 %**
Starkbier	—	—	—	0,0822 g	0,0174 g	0,0364 g	0,0458 g	4,724	0,0364 g	0,0458 g
	0,0996 %	—	—	**82,53 %**	**17,47 %**	**36,55 %**	**45,98 %**		**44,28 %**	**55,72 %**
Dunkles Exportbier	—	—	—	0,0583 g	0,0171 g	0,0323 g	0,0260 g	3,409	0,0323 g	0,0260 g
	0,0754 %	—	—	**77,32 %**	**22,68 %**	**42,48 %**	**34,48 %**		**55,40 %**	**44,60 %**

Durch diese Versuche ist in erster Linie offensichtlich geworden, dass durch die jeweils angewandten Fällungsmittel bei der nämlichen Sorte Bier die gleichen oder doch wenigstens fast gleichen Mengen von Phosphorsäure ausgefällt werden oder umgekehrt ausgedrückt, dass bei unserem Verfahren nicht zufällige Werte resultieren, die nur von den Versuchsbedingungen abhängig bei der geringsten Änderung derselben verschiedene Ergebnisse zeitigen. Kombinieren wir nun diese Tatsache mit dem Beweis, der schon zu Beginn dieses Abschnittes erbracht wurde, dass nämlich einerseits durch Ammoniak alle erdalkaliengebundene durch Magnesiamixtur im Filtrat alle alkaliengebundene Phosphorsäure ausfällt und andererseits der Rest dann als organisch gebunden betrachtet werden muss, so stellen notwendigerweise unsere bei den Versuchen gewonnene Zahlen die ihrer Rubrik entsprechenden Werte dar.

Betrachten wir bei der Zusammenstellung der Resultate die Menge der Gesamtphosphorsäure, so schwankt sie auch hier innerhalb der gewöhnlich angegebenen Grenzen zwischen 0,06—0,10 %; und zwar war es vorauszusehen, dass das Starkbier mit dem grössten Extraktgehalt auf Volumenprozente berechnet die meiste Phosphorsäure enthält, während die hellen und leichten Biere dem niedrigsten Wert am nächsten kommen. Von dieser im Bier vorhandenen Gesamtphosphorsäure ist weitaus der grösste Teil ($^4/_5$ ungefähr) in anorganischer

Bindung vorhanden, obwohl ursprünglich die Gerste ihren Phosphor fast nur in Form organischer Komplexe enthält. Es muss also durch die Malz- und Bierbereitung ein grosser Teil davon durch hydrolytische Spaltung zerlegt worden sein. Auf diese Frage wird später näher eingegangen werden. Die Menge der Erdalkalienphosphorsäure ist ziemlich gleich der alkaliengebundenen und hängt im wesentlichen davon ab, in welcher Quantität das Magnesium resp. Kalium im Bier vorhanden ist. Natrium und Calcium pflegen nur in so kleinen Mengen aufzutreten, dass sie für diesen Punkt nicht in Betracht kommen.

Beim Vergleich der einzelnen Biersorten untereinander ergeben sich keine auffallenden Unterschiede noch bemerkenswerte Regelmässigkeiten. Das dunkle Bier und das Starkbier sind sich in allen Punkten merkwürdig ähnlich. Es ist auch natürlich, dass sich bei einem höheren Gehalt an Gesamtphosphorsäure das Verhältnis der einzelnen Phosphorsäuren zu einander nicht verändert hat. Das Exportbier dagegen geht mit seiner anorganischen Phosphorsäure um 5 % herunter. Weshalb gerade das helle Bier die kleinste Menge organischer Phosphatkomplexe enthält, dafür liesse sich schon ein Grund angeben. Man kann ja annehmen, dass im hellen Malz die Enzyme wirksamer als im dunklen Malz sind, wodurch eine weitgehendere Spaltung der organischen Phosphorverbindungen stattgefunden hat, in derselben Weise, wie es mit der Diastase der Fall ist. Doch könnte darüber blos eine exakte experimentelle Untersuchung Aufklärung bringen.

2. Untersuchung der anorganischen Phosphate.

Die Niederschläge, die durch Ammoniak resp. Magnesiamixtur im Bier sich erzeugen liessen, wurden in grösserer Quantität hergestellt, um sie auf die vorhandenen Basen und eventuell mitniedergerissene organische Substanz zu untersuchen.

1. Erdalkalienphosphorsäure.

2 Liter dunkles Bier wurden mit Ammoniak versetzt. Nach einigen Stunden filtrierte man den Niederschlag ab und trocknete ihn nach sorgfältigem Auswaschen mit ammoniakhaltigem Wasser bei 100°. Die so erhaltene, vollkommen weisse Substanz zeigte unter dem Mikroskop die charakteristischen Kristalle von Ammonium-Magnesiumphosphat und zwar in der Form gekreuzter, gefiederter Nädelchen; von irgendeineramorphen Masse war nichts zu bemerken. Dieses Material wurde nun auf seinen Glühverlust und seine Zusammensetzung untersucht.

1. Glühverlust. Das 4 Stunden bei 100° getrocknete Material wurde ½ Stunde vor dem Gebläse erhitzt und die entstandene Gewichtsabnahme ermittelt. Der Glühverlust berechnet sich als Mittel aus 2 Proben, von denen die eine zur Kationen- die andere zur Anionenbestimmung verwendet wurde.

Probe a. 0,0949 g Substanz verlor beim Glühen 0,0244 g = 25,71 %.
Probe b. 0,2144 g „ „ „ „ 0,0555 g = 25,89 %.
Als Mittel = **25,80** %.

2. Gehalt an Phosphorsäure. Probe a wurde zur Phosphorsäurebestimmung verwendet, indem nach dem Glühen mit Salpeter-Schwefelsäuremischung aufgenommen und die Lösung nach gewohnter Weise weiter behandelt wurde. Das Resultat berechnete man auf geglühte Substanz (0,0705 g). Es ergab sich 0,0439 g P_2O_5 = **62,27** % P_2O_5 auf geglühte Substanz.

3. Gehalt an Kalk. Probe b diente zur Bestimmung der Metalle und musste deshalb zuerst mittels $FeCl_3$ von Phosphorsäure befreit werden. Hierauf fällte man

mit Ammoniumoxalat in ammonialkalischer Lösung und glühte den Niederschlag vor dem Gebläse zu CaO. Die Resultate berechnete man auch hier auf geglühte Substanz (0,1589 g). Es ergab sich 0,0078 g CaO = **4,91** % CaO.

4. Gehalt an Magnesia. Im Filtrat der Kalkfällung bestimmte man das Magnesium durch Natriumphosphat wie üblich. Es wurde als Pyrophosphat gewogen. Es ergab sich 0,1517 g $Mg_2P_2O_7$ = **34,60** % MgO.

Der geglühte Niederschlag setzt sich also zusammen aus:

P_2O_5 = 62,27 % (th. 63,76 %)
CaO = 4,91 %
MgO = 34,60 % (th. 36,24 %)
Summa 101,78 %.

Wie zu vermuten war, enthält der durch Ammoniak erzeugte Niederschlag als Basen die Erdalkalien Ca und Mg und zwar letzteres in weit grösserer Menge, da auch bei Gerste und Malz die Verhältnisse ebenso gelagert sind. L. Weiss (l. c.) fand sogar den wässrigen Malzauszug frei von Kalk, so dass sein Vorkommen im Bier vor allem auf das Brauwasser und eventuell auf den Hopfen zurückzuführen sein wird. Das Calcium wird durch Ammoniak vollständig aus dem Bier niedergeschlagen, was schon daraus erhellt, dass, wie unten gezeigt wird, sich im Magnesiamixturniederschlag keine Spur dieses Elementes mehr nachweisen lässt. Dasselbe ist wohl auch mit dem Magnesium der Fall, was sich aber nur umständlich beweisen lässt. Im Niederschlag befindet sich das Calcium sicherlich als Phosphat und nicht als Corbonat, Oxalat, Acetat oder an eine andere organische Säure gebunden, da die geglühte Substanz absolut neutrale Reaktion zeigte, während andernfalls das entstehende CaO auf Lakmus alkalisch reagieren müsste. Es wird sich wohl ein Magnesium-Calcium-pyrophosphat beim Glühen bilden, was sich auch gut mit dem Verhältnis der erhaltenen Werte von P_2O_5 und MgO zu den theoretischen des reinen $Mg_2P_2O_7$, die bei der obigen Zusammenstellung in Klammern beigefügt sind, in Einklang bringen lässt; denn befinden sich in einem solchen Mischsalz gleiche Mengen Calcium und Magnesium, so sinkt der Phosphorsäuregehalt von 63,76 % auf 59,61 %.

Der Glühverlust von 25,80 % im Mittel besteht aus der Gewichtsabnahme, die das vorliegende Ammoniummagnesiumphosphat ($MgNH_4PO_4 \cdot H_2O$) bei der Umwandlung in Pyrophosphat erleidet und theoretisch 28,39 % beträgt. Es ist also die Anwesenheit von organischer Substanz ausgeschlossen. Gleichwohl wurde auf Eiweiss und Kohlehydrate geprüft, doch ohne ein positives Ergebnis zu erzielen.

2. Alkalienphosphorsäure.

Das Filtrat obiger Ammoniakfällung wurde mit Magnesiamixtur versetzt, der Niederschlag absitzen gelassen, zweimal mit ammoniakhaltigem Wasser dekantiert, abfiltriert und möglichst gut ausgewaschen, was wegen der schlechten Filtration sehr langsam von statten ging. Der Niederschlag konnte auch nicht weiss erhalten werden, sondern blieb bräunlich gefärbt, wie es auch bei fast allen Mixturniederschlägen bei obigen Bieruntersuchungen der Fall gewesen war. Die Substanz wurde dann 4 Stunden bei 100° getrocknet und zeigte unter dem Mikroskop neben den erwähnten Phosphatkristallen Spuren eines amorphen Gerinnsels. Die Untersuchung erstreckte sich hier auf dieselben Punkte wie beim Ammoniakniederschlag; nur musste noch die Kieselsäure quantitativ bestimmt werden, welche in ziemlich bedeutender Menge stets den Mixturfällungen beigemengt ist.

1. Glühverlust. Zwei verschiedene Proben wurden vor dem Gebläse ½ Stunde geglüht, bis sie vollkommen weiss geworden waren.

Probe a 0,1058 g Substanz verlor beim Glühen 0,0311 g = 29,40%.
Probe b. 0,1103 g „ „ „ „ 0,0327 g = 29,65%.

Als Mittel **29,53%**.

2. Gehalt an SiO_2. Die Kieselsäure wurde wie üblich durch mehrmaliges Abrauchen der geglühten Substanz mit HCl quantitativ abgeschieden und als SiO_2 zur Wägung gebracht. Es kamen 2 Versuche zur Ausführung, wovon der erste zur Phosphorsäure-, der zweite zur Basenbestimmung weiter verwendet wurde. Diese sowie die folgenden Resultate sind auf geglühte Substanz berechnet.

Probe a. 0,1469 g geglühte Substanz ergab 0,0285 g SiO_2 = 19,43% auf geglühte Substanz
Probe b. 0,1522 g „ „ „ 0,0297 g SiO_2 = 19,51% „ „ „

Als Mittel = **19,47%** SiO_2 in der geglühten Substanz.

3. Gehalt an Phosphorsäure. Probe a von SiO_2 befreit wurde nach der Lorenzmethode auf Phosphorsäure untersucht. 0,1469 g geglühte Substanz ergab 0,0574 P_2O_5 = **39,09%** P_2O_5 auf geglühte Substanz.

4. Gehalt an Kalk. Probe b wurde mittels $FeCl_3$ von Phosphorsäure befreit, ammoniakalisch gemacht, mit Ammoniumoxalat versetzt und 12 Stunden stehen gelassen. Als nach dieser Zeit sich absolut kein Niederschlag zeigte, so konnte man mit Sicherheit die vollständige Abwesenheit von Kalk annehmen.

5. Gehalt an Magnesia. Zur kalkfrei befundenen Lösung wurde Natriumphosphat gegeben und der entstandene Niederschlag als Pyrophosphat zur Wägung gebracht. 0,1522 g geglühte Substanz ergab 0,1750 g $Mg_2P_2O_7$ = **41,67%** P_2O_5 auf geglühte Substanz.

Der geglühte Niederschlag setzt sich also zusammen aus:

SiO_2 = 19,47%
P_2O_5 = 39,09%
CaO = —
MgO = 41,67%
Summa 100,23%.

Besonders bemerkenswert ist die vollständige Abwesenheit von Kalk, gleichbedeutend mit der Bestätigung unserer Annahme, dass durch Ammoniak schon alle an Erdalkalien gebundene Phosphorsäure ausgefällt wird. Überraschend bleibt für uns der hohe Kiselsäuregehalt in dem mit Magnesiamixtur im Bier erhaltenen Niederschlag. Die Form, in welcher die Kieselsäure im Bier vorhanden ist, ob in anorganischer, ob in organischer Bindung ist bis heute noch nicht aufgeklärt, da einer exakten Untersuchung dieser Frage grosse Schwierigkeiten entgegentreten, besonders in der geringen Quantität, in der die Kieselsäure im Bier vorkommt, sowie in dem Mangel einer Bestimmungsmethode, die es wie bei der Phosphorsäure ermöglicht minimale Mengen durch Erzeugung eines voluminösen Niederschlages genau zu wägen. Da die Kieselsäure im Bier schwerlich in Form einer echten Lösung enthalten ist, sondern nur als Kolloid, so ist es leicht begreiflich, dass durch Zugabe von Magnesiamixtur eine Ausfällung herbeigeführt wird. Dabei muss die Kieselsäure mit dem Magnesium auch eine unlösliche Verbindung eingehen, da von der gewogenen Menge MgO nur 22,22% auf die Phosphorsäure treffen. Die übrigen 19,45% müssen mit der Kieselsäure zusammengetreten sein, was dann fast genau der Formel $2\,SiO_2 \cdot 3\,MgO$ entsprechen würde.

Der theoretische Glühverlust lässt sich hier nicht so einfach berechnen, da die beigemengte Kieselsäure wesentliche Veränderungen bedingt. Eine Spur

von Eiweiss konnte diesmal mittels Millons Reagens nachgewiesen werden, während das Naphtolreagens auf Kohlehydrate nicht ansprach. Doch zeigte sich beim trockenen Erhitzen der Substanz im Röhrchen eine schwache Rotfärbung auf Anilinacetatpapier. Beim Kochen mit verdünnter HCl trat diese Reaktion nicht ein. Also scheinen keine Pentosen, sondern nur Hexosen anwesend zu sein.

3. Untersuchung der organischen Phosphorsäure.

Denjenigen Teil der Phosphorsäure im Bier, der durch Magnesiamixtur nicht gefällt wird, haben wir bis jetzt schlechtweg als organisch gebunden bezeichnet ohne eine nähere Erklärung für diesen Ausdruck zu geben. Wir verstehen darunter Verbindungen organischer Natur, welche in ihrem Moleküle Phosphor oder die Phosphorsäuregruppe enthalten. Derartige Körper gibt es zahlreiche. Um einige mit Namen zu nennen, so seien erwähnt die grosse Gruppe der Phosphatide, deren Definition heute noch nicht einwandfrei festgelegt ist, wozu die Lecithine, das Kephalin, Cuorin, Jecorin, Myelin u. v. a. gehören, ferner das Phytin, die mit Eiweiss verbundenen Nukleoalbumine und Nukleoproteide und dann die ausgedehnte Zahl der Phosphorsäureester mit den Zuckerarten, mit Glyzerin und vielen anderen Substanzen. Was von alledem beim Bier in Betracht kommt, darüber versucht dieses Kapitel einigen Aufschluss zu geben.

Dass der bei der Zugabe von Magnesiamixtur in Lösung bleibende Teil der Phosphorsäure kein zufälliger, von dem Fällungsmittel bedingter Wert ist, dafür spricht der Umstand, dass wir aus demselben Bier durch Urantitration fast die gleiche Menge an organischer Phosphorsäure erhalten. Dies ist ein wesentliches Moment für den Beweis des Vorhandenseins der organischen Phosphate im Bier. Das Zahlenmässige dieser Frage wurde eingangs bei der Urantitrationsmethode unter dem Abschnitt, welcher die Beispiele für die „direkte Titration" erbringt, behandelt.

Auch soll ein Einwand widerlegt werden, der sich machen lässt, wenn man die gerade oben nachgewiesene geringe Mitfällung von Zucker und Eiweiss durch Magnesiamixtur im Auge behält. Es könnte nämlich behauptet werden, dass vielleicht durch eine konzentriertere Magnesiumlösung ein Teil der für organisch angesprochenen Phosphorsäure ausgefällt oder ausgesalzen werde und so ein strenger Unterschied zwischen anorganischen und organischen Phosphaten überhaupt nicht gemacht werden dürfe. Deshalb wurden zweimal je 100 cc eines Bieres, das durch Ammoniak von Erdalkalienphosphorsäure befreit worden war, abgemessen und die erste Probe wie gewöhnlich mit Mixtur, die zweite Probe mit der fast 4fachen Menge $MgSO_4$, als sie in der Mixtur enthalten ist, und etwas Ammoniumchlorid versetzt. Beide Niederschläge wurden nach v. Lorenz weiter behandelt. Es ergab

die 1. Probe 0,8968 g Molybdänniederschlag = 0,0295 g P_2O_5;
die 2. Probe 0,8969 g „ „ = 0,0295 g P_2O_5.

Dies ist ein neuer Beweis, dass die Menge der organischen Phosphate im Bier einen konstanten Wert darstellt und auch dafür, dass, wenn wirklich durch die aussalzende Wirkung der zur Fällung der Phosphate zugegebenen Salze ein wesentlicher Teil organischer Substanz niedergeschlagen wurde, keine organischen Phosphorverbindungen sich darunter befinden. Ein Versuch durch Sättigung

von Bier mit Ammoniumnitrat absichtlich organische Phosphorverbindungen auszusalzen blieb ergebnislos.

Im Anschluss daran mögen noch zwei andere Versuche erwähnt werden, die es ebenfalls bezweckten die organischen Phosphorkomplexe abzuscheiden und es dabei besonders auf die Eiweissverbindungen abgesehen hatten.

1. Ausscheidung durch Koagulation. 3 Liter dunklen Bieres wurden im Kolben mit freier Flamme zum lebhaften Kochen erhitzt. Man dampfte bis auf den 3. Teil des ursprünglichen Volumens ein, wobei sich zahlreiche Eiweissflocken abschieden. Diese wurden filtriert, mit heissem Wasser ausgewaschen und verascht. Es zeigte sich keine Spur von Phosphorsäure.

2. Ausscheidung mit Tannin. Eine grössere Menge Bier wurde mit verdünnter wässeriger Tanninlösung versetzt. Da der Niederschlag sich nicht absetzen wollte, gab man wenig Gelatinelösung zu, welche den Überschuss des Tannins unschädlich machte. Dadurch bekam der Niederschlag grobflockige Gestalt und liess sich leicht mehrmals mit kaltem Wasser dekantieren. Dann wurde er noch 6 mal auf dem Filter ausgewaschen. Beim Veraschen ergab er nur so minimale Mengen von Phosphorsäure, dass die Sache nicht weiter verfolgt wurde.

Das einzige Mittel, durch das etwas Aufschluss über die Natur der organischen Phosphate gegeben werden konnte, war eine Fällung mit Bleiessig.

Trennung der organischen Phosphate in Protein- und Kohlehydratphosphate.

Bleiessig bildet ein oft gebrauchtes Reagens um aus dem Bier Eiweiss abzuscheiden. Durch einen qualitativen Vorversuch wollten wir erfahren, wie sich die organischen Phosphate dabei verhalten. Eine kleine Quantität Bier, welche durch Magnesiamixtur vollkommen von anorganischer Phosphorsäure befreit war, wurde mit Bleiessig versetzt, der Niederschlag absitzen gelassen, abfiltriert, ausgewaschen und mit verdünnter Schwefelsäure behandelt. Die Lösung ergab beim Veraschen starke Phosphorsäurereaktion. Merkwürdigerweise enthielt aber auch das Filtrat der Bleiessigfällung noch eine beträchtliche Menge an Phosphaten. Dies ist nicht anders zu erklären, als dass eben ein Teil der organischen Phosphate an Proteinstoffe gebunden gedacht werden muss, während ein anderer Teil mit Kohlehydraten kombiniert sich vorfindet. Es wurde nun versucht diese Verhältnisse quantitativ festzulegen und dabei folgendermassen vorgegangen.

100 cc Bier wurden mit Ammoniak und Magnesiamixtur versetzt, die ausgeschiedene Phosphorsäure nach einigem Stehen abfiltriert und gut ausgewaschen. Das Filtrat nebst den Waschwässern wurde auf dem kochenden Wasserbad möglichst von Ammoniak befreit, jedoch um dabei nicht zu stark zu konzentrieren das verdampfte Wasser immer wieder ersetzt. Das Ammoniak vollständig zu verjagen ist unmöglich, da die kolloiden Substanzen stets kleine Mengen davon zurückhalten. Dies wirkt für die weitere Behandlung nicht störend. Die erhaltene Lösung wurde darauf so lange, bis sich kein Niederschlag mehr bildete, mit Bleiessig versetzt. Ein Überschuss erschwert das spätere Filtrieren. Nachdem der voluminöse, weissgelbe Niederschlag sich zu Boden gesetzt hatte, was 6—8 Stunden in Anspruch nahm, wurde filtriert und zweimal mit bleiessighaltigem, kaltem Wasser ausgewaschen. Darauf löste man den Niederschlag mit verdünnter,

warmer Schwefelsäure vom Filter, wobei ein Teil als $PbSO_4$ auf dem Filter zurückblieb, während die Hauptmenge mit hindurchgerissen wurde. Es ist deshalb eine zweite Filtration notwendig. Die klare Lösung, welche die Farbe eines normalen Bieres wieder angenommen hatte, da durch das Bleisalz auch die Bierfarbstoffe gefällt werden, wurde jetzt zur Trockene verdampft, verascht und auf Phosphorsäure geprüft. Es ergab sich 0,0061 g P_2O_5.

Das Filtrat der Bleiessigfällung mit den beiden Waschwässern vereinigt wurde mittels Schwefelsäure vollkommen vom Bleiessig befreit und nach der Filtration die klare gelbliche Lösung verascht. Es ergab sich 0,0084 g P_2O_5. Die gesamtorganische Phosphorsäure berechnet sich daraus zu 0,0145 g P_2O_5.

Dieser Wert stimmt sehr gut überein mit dem Resultat, das sich bei einer 2. Probe durch Veraschung des Filtrates der Mixturfällung ergab. Es betrug 0,0139 g P_2O_5. Bei der Untersuchung ist also nichts verloren gegangen.

In Prozente umgerechnet beträgt
die wahrscheinlich an Eiweiss gebundene Phosphorsäure **42,07 %** der ges. org. P_2O_5,
die an Kohlehydrat gebundene Phosphorsäure . . . **57,93 %** der ges. org. P_2O_5.

Es lag nun die Aufgabe vor diese beiden Gruppen genauer zu untersuchen.

1. Eiweissphosphate.

Man stellte sich aus 1 Liter eines von anorganischer Phosphorsäure befreiten Bieres den Bleiniederschlag her und zwar unter denselben Bedingungen wie oben. Dieser wurde wieder mit verdünnter Schwefelsäure behandelt. Das Filtrat vom $PbSO_4$ machte man ammoniakalisch, konzentrierte es auf dem Wasserbad bis auf ein Volumen von 350 cc und versetzte es mit Magnesiamixtur. Nach 24 Stunden wurde der entstandene Niederschlag auf Phosphorsäure geprüft, wobei sich nur ganz minimale Spuren nachweisen liessen. Es ist also auch jetzt, wo die Hauptmenge der Kohlehydrate weggeschafft ist, nicht möglich mit Magnesiamixtur Phosphorsäure auszufällen. Dies ist ein neuer Beweis für die Anwesenheit organischer Phosphate speziell von Proteinphosphaten im Bier. Diese scheinen auch ziemlich schwer zersetzlich zu sein, da sie durch die vorausgegangene Behandlung nicht gespalten wurden. Die ammoniakalische Eiweisslösung wurde nun mit dem gleichen Volumen Alkohol (96 %) durchgemischt, wobei sich ein kleiner Rest Dextrin abschied. Das Filtrat davon enthielt die Eiweissphosphate in reinster Form. Trotz mannigfacher Versuche erwies es sich als unmöglich sie auszufällen oder auf eine andere Art sie in fester Form zu erhalten. Auch durch Eindampfen der Lösung erzielte man nur eine amorphe braune Ausscheidung.

Deshalb wurde nur noch der Versuch angestellt, ob diese Eiweissphosphate durch ein Alkohol-Äthergemisch sich extrahieren liessen. Zu diesem Zweck verdampfte man die gauze noch übrige Lösung mit Sand zur Trockene und extrahierte diese Masse, nachdem sie möglichst gut getrocknet und pulverisiert worden war, mit einem Gemenge von 1 Teil Alkohol und 2 Teilen Äther 6 Stunden lang in der Hitze. Der stark gelb gefärbte Extrakt wurde verdampft und verascht, wobei sich das Protein durch seinen charakteristischen Geruch zu erkennen gab. Ausserdem ergab die Asche eine nennenswerte Menge an Phosphorsäure. Unter den Eiweissphosphaten befinden sich also solche, welche sich durch Alkohol-Äther extrahieren lassen. Diese Eigenschaft deutet auf eiweisshaltige Phosphatide oder ähnliche Verbindungen hin. Jedenfalls aber hat dieser Versuch wiederum gezeigt, dass wir es hier mit organischen Phosphorkomplexen zu tun haben, da nur diese durch Alkohol-Äther gelöst werden können.

2. Kohlehydratphosphate.

Zu diesen Verbindungen gelangten wir auch auf einem ganz anderen Wege als auf dem der Bleiessigfällung, wodurch uns ja zuerst ihr Nachweiss glückte. Bei der Fahndung auf Lecithin nämlich, wovon später die Rede sein wird, mussten wir öfters alkoholische Bierextrakte herstellen. Diese enthielten nun eine mit Äther fällbare Substanz, die sich als phosphorhaltiger Zucker erwies. Es war sehr erfreulich auf diese Weise eine Bestätigung der oben gemachten Annahme betreffs des Vorhandenseins von Glukophosphaten im Bier zu erhalten. Die Isolierung derselben gestaltete sich sehr einfach. Eine grössere Menge Bier wurde mit Sand zur Trockene verdampft, wobei man auf 100 g Bier mindestens 30 g Sand nehmen musste um eine pulverisierbare Masse zu erhalten. Die so vorbereitete Substanz soll möglichst schnell verarbeitet werden, da sie äusserst hygroskopisch ist und dadurch schmierig wird. Sie wurde nun im Soxhletapparat 12 Stunden lang mit Alkohol (96%) extrahiert. Der Extrakt war stark gelb gefärbt und an den Wänden des Extraktionskölbchens klebte eine karamelisierte braune Masse, welche mit Alkohol nicht mehr in Lösung zu bringen war. Sie löste sich aber leicht und klar in Wasser. Der konzentrierte alkoholische Extrakt ergab mit Äther eine bedeutende Abscheidung eines phosphorhaltigen Kohlehydrates, die in Wasser gelöst mit obiger Karamellösung vereinigt wurde; denn diese enthielt gleichfalls Glukophosphorsäuren. Dieser Versuch wurde auch mit Bier, das von anorganischen Phosphaten befreit war, wiederholt und dabei dasselbe Resultat erzielt.

Diese Lösung der Kohlehydratphosphate versetzte man mit Ammoninak und Magnesiamixtur. Der nach 24 Stunden abfiltrierte Niederschlag erwies sich als vollkommen frei von Phosphor. Es war also die extrahierte Phosphorsäure in organischer Form vorhanden. Zum sicheren Nachweis des Zuckers wurde mittels Fehlingscher Lösung geprüft und eine deutliche Kupferoxydulabscheidung erhalten.

Die Auffindung dieser Gluckophosphorsäuern im Bier ist schon deshalb von Interesse, weil man gerade in den letzten Jahren sich ziemlich eingehend mit diesen Körpern zu beschäftigen begonnen hat. Man versteht darunter Phosphorsäureester irgend eines Kohlehydrates. Sie bilden sich auch als Zwischenprodukte bei der Hefepresssaftgärung bei Anwesenheit von Phosphaten und man vermutet in dem Koënzym der Zymase nichts anderes als einen solchen Zuckerphosphorsäureester. Ob auch bei der Hefegärung selbst solche Verbindungen entstehen, darüber sollen erst neue Arbeiten Aufschluss geben von Harden und Joung: Proc. chem. Soc. 24. 115; Proc. royal Soc. London, Serie B. 77/405; 80/299; 81/366, sowie von Lebedew: Biochem. Zeitschrift 20/114.

Diese im Bier vorhandenen organischen Phosphate wurden der Hydrolyse unterworfen.

Hydrolyse der organischen Phosphate.

Man stellte sich zu diesem Zweck wiederum ein von anorganischer Phosphorsäure befreites Bier her, verdampfte möglichst vollkommen das zugegebene Ammoniak und brachte die Flüssigkeit ungefähr auf das ursprüngliche Volumen des verwendeten Materials. 4 Proben von je 150 cc wurden in Soxhletflaschen mit so viel HCl versetzt, dass die Lösung gerade 3% HCl enthielt. Dann er-

hitzte man sie verschiedene Zeiten lang im kochenden Wasserbad. Nach dem Erkalten spülte man quantitativ in ein Becherglas, versetzte mit Ammoniak und Magnesiamixtur ohne von der durch die Inversion ausgeschiedenen kohligen Substanz abzufiltrieren, da diese bei einigen Vorversuchen sich stets als phosphorfrei erwiesen hatte, und liess einen Tag stehen. Der Niederschlag wurde sodann verascht und die Phosphorsäure darin quantitativ bestimmt.

Das zur Hydrolyse verwendete Bier ergab **0,0246 g** P_2O_5 in 150 cc.

Die erhaltenen Resultate sind dann in folgender Tabelle zusammengestellt.

1. Hydrolyse mit HCl im kochenden Wasserbad.

Dauer der Hydrolyse	g P_2O_5 hydrolysiert	Pzt. der ges. org. P_2O_5
2 Stunden	0,0018 g	7,32%
3,5 Stunden	0,0027 g	10,98%
5 Stunden	0,0030 g	12,19%
15 Stunden	0,0053 g	21,54%

2. Hydrolyse mit H_2SO_4 im kochenden Wasserbad.

Dauer der Hydrolyse	g P_2O_5 hydrolysiert	Pzt. der ges. org. P_2O_5
4 Stunden	0,0008 g	4,28%
8 Stunden	0,0015 g	8,02%

Ausserdem wurde noch eine Hydrolyse mit 3% H_2SO_4 ausgeführt unter den gleichen Bedingungen wie eben. Die zur Verwendung kommende Substanz enthielt **0,0187 g** P_2O_5 in 100 cc. Es wurden diesmal stets nur 100 cc hydrolysiert.

Diese beiden Versuche zeigen, dass selbst bei langer Einwirkungsdauer von Säuren in der Hitze nur ein kleiner Bruchteil der organischen Phosphate zersetzt werden kann. Hätten wir es nur mit einer Adsorption von Phosphorsäure an organische Komplexe zu tun und nicht mit echten Verbindungen, so müsste sich schon durch äusserst geringe Säuremengen eine Spaltung herbeiführen lassen. Auch kann jetzt der Einwand, dass vielleicht doch die Kohlehydrate, in erster Linie die Dextrine, der Fällung der als organisch gebunden angesprochenen Phosphorsäure hinderlich seien, endgültig widerlegt werden, da diese Körper schon bei einem dreistündigen Kochen in 2% HCl-Lösung vollständig abgebaut werden.

Da man annehmen durfte, dass eine Spaltung der organischen Phosphorverbindungen doch auf irgendeine Weise sich durchführen lassen müsste, so wurde zu stärkeren Mitteln gegriffen. Mit der Säurekonzentration in die Höhe zu gehen schien nicht ratsam, weil die notwendige Neutralisation die Salzmenge zu stark vermehren würde. Auch die Dauer der Hydrolyse über 15 Stunden auszudehnen war nicht angängig. Es blieb also nichts übrig, als bei höherer Temperatur und grösserem Druck zu arbeiten. Eine 3%ige HCl- resp. H_2SO_4-Lösung eines Bieres, das wie bei den ersten beiden Versuchen vorbereitet war, wurde 6 Stunden mit 5 Atm. behandelt. Dabei schied sich eine reichliche Menge von Huminsubstanzen aus. Der mit Ammoniak und wenig Magnesiamixtur erzielte Niederschlag enthielt diesmal die gesamte organische Phosphorsäure in anorganischer Form. Die Tabelle gibt darüber Aufschluss.

Je 100 cc wurden hydrolysiert. Die Lösung enthielt **0,0187 g** P_2O_5 in 100 cc.

3. Inversion bei 6 Atm.

Art der Säure	g P_2O_5 hydrolysiert	Pzt. der ges. org. P_2O_5
3% HCl	0,0189 g	100%
3% H_2SO_4	0,0188 g	100%

Auf diese Weise ist es also gelungen die organischen Phosphorkomplexe vollkommen zu spalten. Da so starke Mittel dazu aufgewendet werden mussten, erscheint ihr Vorhandensein als sichergestellt.

Am Ende dieses Abschnittes mögen noch 2 Versuche angeführt werden, die sich mit dem Nachweis von Lecithin und Phytin im Bier befassen.

1. Lecithin.

Es ist schon lange bekannt, dass Cholin im Bier vorzukommen pflegt. Es findet sich auch in der Würze, Kjeldahl: Zeitschrift für das gesamte Brauwesen 91 S. 411. Dort führt er unter anderem aus, dass eine Würze welche 24 Stunden mit Kalk in der Kälte behandelt wurde, fast die doppelten Werte für Cholin ergibt. „Ausser dem freien Cholin enthält somit die Würze noch eine grosse Menge dieser Basis gebunden. Diese Verbindung wird durch $Ca(OH)_2$ bei niederer Temperatur zerlegt. Ob wir es hier mit Lecithin zu tun haben oder mit einer Verbindung des Cholins mit phosphorsaurem Glyzerin, kann ich zur Zeit nicht angeben.“ Während nach alledem Lecithin im Bier zu vermuten ist, gelang es bis heute nicht es einwandfrei nachzuweisen. Auch unsere Versuche in diesem Punkt waren erfolglos.

Es bietet sich im Prinzip nur ein Weg um aus dem Bier Lecithin herauszuholen, durch Extraktion mit Alkohol oder Äther. Es sammelt sich deshalb bei der Glyzerinbestimmung des Bieres im sog. Rohglyzerin an. Man stellte einen solchen Versuch im Grossen an nach der vorgeschriebenen Methode. Zum Nachweis des Lecithins diente stets eine alkoholische $CdCl_2$-Lösung, mit welcher jener Körper einen schwer löslichen Niederschlag bildet. Tatsächlich ergab auch das Rohglyzerin mit diesem Reagens eine Fällung, welche organische Substanz zu enthalten schien. Aber sie war frei von Phosphorsäure.

Nun setzten wir einen neuen Versuch an, indem wir das Bier nur mit Sand — auf 100 Teile Bier 30 Teile Sand — zur Trockene brachten, da nach Kjeldahls Untersuchungen der zuerst zugegebene Kalk eine Zersetzung des Lecithins herbeigeführt haben mochte. Die trockene, fein pulverisierte Masse wurde im Soxhlet-Apparat mit Alkohol extrahiert. Der so erhaltene, dunkel gefärbte Extrakt schied mit Äther die schon erwähnten Glukophosphorsäueren ab. Es blieb nur ein kleiner in Äther löslicher Bestandteil. Beim Veraschen trat der bekannte Geruch nach verbranntem Fett auf, wie dies auch das Lecithin tut. Aber weder der $CdCl_2$-Niederschlag noch das veraschte Filtrat ergab eine Phosphorsäurereaktion.

Eine andere Ätherextraktion führten wir aus, indem wir 500 cc Bier mit Äther fest durchschüttelten. Nach zweistündigem Stehen liessen sich die Schichten leicht trennen. Dieser Versuch wurde dreimal wiederholt und die Äther-Mengen vereinigt. Nachdem man die mitgerissenen Kolloide mit wenig Alkohol abgeschieden hatte, verdunstete man den Äther und veraschte den minimalen Rückstand. Auch hier war keine Phosphorsäure nachweisbar.

Es scheint das Lecithin, wenn überhaupt im Bier vorhanden, in solch kleinen Mengen darin vorzukommen, dass man zu einem Nachweis grosse Quantitäten

verarbeiten müsste. Innerhalb der von uns als organische Phosphate bezeichneten Gruppe spielt es darum keine Rolle.

2. Phytin.

Das Phytin müsste sich in dem zur Fällung der Erdalkalienphosphorsäure erzeugten Niederschlägen vorfinden, da es nach einer Arbeit von Geys, der die Anwesenheit von Phytin in den Gerstenspelzen konstatierte, in Ammoniak unlöslich ist. Wir wollen uns hier nicht weiter auf diesen Körper einlassen, da wir gelegentlich der Gerstenuntersuchungen uns noch eingehender damit befassen müssen. Soviel sei nur gesagt, dass der Ammoniakniederschlag im Bier auf Phytin untersucht wurde und sich dabei ein negatives Resultat ergab. Man löste nämlich eine grössere Portion der Ammoniakfällung aus dem Bier, welche sich unter dem Mikroskop frei von amorpher Substanz zeigte — bei einiger Übung vermag man das Phytin leicht zu erkennen — in 0,2% HCl-Lösung auf und versuchte durch Erhitzen oder durch Alkohol eine Abscheidung herbeizuführen. Beides war erfolglos. Man darf wohl mit Sicherheit die Abwesenheit von Phytin im Bier annehmen. Auch die Gründe hierfür werden später zu erörtern sein.

Zusammenfassung.

Dieser Abschnitt hat gezeigt, dass von den Phosphaten im Bier nur 80% ungefähr in anorganischer Form vorhanden ist. Davon ist wieder die eine Hälfte an Erdalkalien die andere an Alkalien gebunden.

Innerhalb verschiedener Biersorten scheint dieses Verhältnis nur geringen Schwankungen zu unterliegen. Der Rest der Phosphorsäure ist organischer Natur, wobei ein Teil wahrscheinlich mit Eiweisskörpern ein anderer mit Kohlehydraten zusammengetreten ist. Diese organischen Phosphorkomplexe sind schwer zu spalten. Erst durch Mittel, welche die organischen Moleküle selbst zerstören, lässt sich eine Hydrolyse der Verbindungen herbeiführen. Lecithin sowie Phytin sind im Bier nicht vorhanden.

III. Untersuchungen über die Phosphorsäureverhältnisse während der Gärung und in der Würze.

Da die Hefe zu ihrer Lebenstätigkeit bekanntlich Phosphorsäure bedarf, so war es von Interesse zu untersuchen, ob durch die Gärung eine Verschiebung des Mengenverhältnisses der organischen zur anorganischen Phosphorsäure stattfindet; denn man kann sich leicht vorstellen, dass die eine Art der Phosphate für die Hefe leichter assimilierbar ist als die andere oder in stärkerem Masse als Stoffwechselprodukt abgeschieden wird.

Bevor der Einfluss der Hefe auf Würze selbst studiert wurde, stellte man einige orientierende Vorversuche an, die Aufschluss geben sollten über die Aufnahme respektive Abgabe von Phosphaten durch die Hefe während der Gärung.

1. Gärung in nährsalzfreier Zuckerlösung.

Eine 10%ige Rohrzuckerlösung mit destilliertem Wasser versetzte man mit 10% Hefe und liess die Gärung 5 Tage bei Zimmertemperatur gehen, wobei

der Zucker fast vollständig vergoren wurde. Nachdem man die Hefe abfiltriert hatte, wurde die Flüssigkeit eingedampft, verascht und auf Phosphorsäure geprüft. Da das Resultat positiv ausfiel, wurde eine quantitative Bestimmung ausgeführt. Es sei bemerkt, dass von den Hefezellen rund 40% nach der Gärung als tot bezeichnet werden mussten.

a. Die Gesamtphosphorsäure wurde bestimmt durch Veraschen von 50 cc und ergab auf 100 cc berechnet **0,0055** g P_2O_5.

b. Die anorganische Phosphorsäure durch Magnesiamixtur gefällt ergab 0,0029 g P_2O_5 = **52,73%** der ges. P_2O_5.

c. Die organische Phosphorsäure berechnet sich daraus zu 0,0026 g = **47,27%** der ges. P_2O_5.

2. Gärung in einer phosphorsäurefreien Haydukschen Nährlösung.

Eine Hayduksche Nährlösung wurde genau nach Vorschrift hergestellt nur unter Weglassung des K_2HPO_4. 100 g Rohrzucker, 2,5 g Asparagin und 20 g Mineralsalzlösung löste man mit Leitungswasser zu 1 Liter auf. Die Mineralsalzlösung enthielt 17 g $MgSO_4$ im Liter destillierten Wassers. Man liess 4 Tage mit 3% Hefe bei 25° im Brutschrank gären. Die Vergärung war eine fast vollständige. Von den Hefezellen waren über 60% getötet. Die quantitative Analyse lieferte folgende Werte.

a. Die Gesamtphosphorsäure bestimmte man durch Veraschen von 50 cc. Sie ergab für 100 cc **0,0058** g P_2O_5.

b. Die anorganische Phosphorsäure fällte man mit Magnesiamixtur und ergab für 100 cc 0,0038 g P_2O_5 = **65,52%** der ges. P_2O_5.

c. Die organische Phosphorsäure berechnet sich daraus zu 0,0020 g P_2O_5 = **34,48%** der ges. P_2O_5.

3. Gärungen mit normalen Haydukschen Nährlösungen.

Von diesem Versuch setzte man zwei Proben an um Kontrollwerte zu erhalten. Diese Haydukschen Nährlösungen unterscheiden sich bezüglich ihrer Phosphate nur dadurch von den Bierwürzen, dass letztere auch noch organische Phosphorsäure enthalten. Wir können an diesem Material also die besten Vorstudien machen.

Erster Versuch.

Man bereitete sich eine Hayduksche Nährlösung, welche wie oben hergestellt war; nur enthielt die Mineralsalzlösung, von der 20 cc zur Verwendung kamen, neben 17 g $MgSO_4$ noch 50 g K_2HPO_4 im Liter. Die Gärung wurde mit 3% Hefe 4 Tage lang im Brutschrank bei 25° durchgeführt. Nur vereinzelte Hefezellen waren getötet. Zur Gärung setzte man ein genau abgemessenes Flüssigkeitsvolumen an, wusch nach Vollendung des Versuchs die Hefe sorgfältig mit Wasser aus und konzentrierte Filtrat nebst Waschwässer auf das ursprüngliche Volumen. Darin wurden die Phosphoranalysen ausgeführt.

Auch in der Haydukschen Nährlösung vor der Gärung wurde der Gehalt an Phosphorsäure nach der Lorenz-Methode bestimmt; und zwar veraschte man einerseits 50 cc davon und brachte in der Asche die Phosphorsäure zur Wägung, andererseits fällte man mit Magnesiamixtur und verarbeitete den Niederschlag wie üblich weiter. Dadurch wurde gezeigt, dass selbst durch 10% Zucker die anorganischen Phosphate nicht zurückgehalten werden.

Auf 100 cc berechnet ergab sich durch Veraschen 0,0533 g P_2O_5,
durch Mixturfällung 0,0527 g P_2O_5.

Das sind kaum nennenswerte Unterschiede. Das Mittel aus beiden Werten **0,0530** g P_2O_5 liegt den folgenden Berechnungen zugrunde als „ursprüngliche Phosphorsäure".

a. Die Gesamtphosphorsäure durch Veraschen der vergorenen Lösung ergab auf 100 cc berechnet **0,0505** g P_2O_5 Es sind also vergoren 0,0025 g = **4,72** % der ursprünglichen P_2O_5.

b. Die anorganische Phosphorsäure durch Magnesiamixtur abgeschieden ergab 0,0452 g P_2O_5 = **89,52** % der ges. P_2O_5.

c. Die organische Phosphorsäure berechnet sich daraus zu 0,0053 g P_2O_5 **10,48** % der ges. P_2O_5.

Zweiter Versuch

Eine andere Hayduksche Nährlösung wurde unter denselben Bedingungen vergoren; nur stellte man hier nach der Gärung nicht wieder das ursprüngliche Volumen her, sondern beobachtete, ob überhaupt bei der Gärung eine wesentliche Volumenänderung auftritt. Das ursprüngliche Volumen der Würze mit der Hefe betrug genau 250 cc und war durch die Gärung auf etwas mehr als 255 cc angewachsen, wobei aber noch die Vermehrung der Hefezellen in Betracht zu ziehen ist, was auch zur Vermehrung des Endvolumens einen Teil beiträgt Es wird also der Fehler gering anzuschlagen sein, den man durch die Annahme macht, dass das Volumen vor und nach der Gärung das gleiche bleibt. Die quantitative Analyse der von Hefe befreiten Flüssigkeit ergab folgende Resultate.

Die ursprüngliche zur Gärung angestellte Hayduk-Lösung ergab an Phosphorsäure in 2 Proben 0,0552 g P_2O_5 und 0,0549 g P_2O_5 in 100 cc. Als Mittel wurde den Berechnungen zu Grunde gelegt **0,0551** g P_2O_5 ursprüngliche Phosphorsäure.

a. Die Gesamtphosphorsäure durch Veraschung der vergorenen Flüssigkeit ergab auf 100 cc berechnet **0,0377** g P_2O_5. Es sind also vergoren 0,0174 g P_2O_5 = **31,58** % der ursprünglichen P_2O_5.

b. Die anorganische Phosphorsäure durch Mixturfällung bestimmt ergab 0,0351 g P_2O_5 = **93,10** % der ges. P_2O_5.

c. Die organische Phosphorsäure berechnet sich daraus zu 0,0026 g P_2O_5 = **6,90** % der ges. P_2O_5.

Ergebnis.

Bei den letzten beiden Versuchen ist etwas auffallend die Differenz zwischen den von der Hefe verzehrten Phosphorsäuremengen Dass bei dem 1. Versuch dieser Wert kleiner ausfiel, ist unter Umständen nur auf die Arbeitsweise zurückzuführen, indem durch das Auswaschen der Hefe oder durch das Eindampfen der Lösung unbekannte Momente hinzukamen, die dies bewirkten. Andererseits ist der entsprechende Wert bei dem 2. Versuch sehr hoch im Vergleich zu den im nächsten Abschnitt angeführten Gärversuchen mit Würze. Auch dafür lässt sich schwer ein entscheidender Grund anführen. Doch es kommt uns hier nicht so sehr auf das Zahlenmässige als auf das Prinzip an. In phosphorhaltigen Nährlösungen resorbiert die Hefe bei der Gärung, wie bekannt, eine gewisse Menge von Phosphorsäure. Dazu kommt noch, dass, wenn die Hefe die Möglichkeit hat ihre Gärwirkung zu entfalten und gleichzeitig sich zu vermehren, sie in einer Lösung, welche keine Phosphate enthält, Phosphorsäure abgibt und zwar nicht nur in anorganischer, sondern auch in organischer Form. Letztere tritt sogar oft in ganz beträchtlicher Menge auf; bei der Gärung in nährsalzfreier Rohrzuckerlösung machte sie fast die Hälfte der gesamtausge-

schiedenen Phosphate aus. Dieser Vorgang ist leicht zu erklären; denn, da die Phosphate für das Wachstum und die Vermehrung der Hefezellen unbedingt vonnöten sind, so wird zugunsten der neuentstehenden durch das Fehlen dieser wesentlichen Nährsubstanz ein grosser Teil von ihnen zum Absterben gebracht. Der Versuch ergab im Höchstfalle 60 Prozent. Durch die tote Membran vermögen dann Salze zu diffundieren, wodurch die Lösung einen gewissen Gehalt an Phosphorsäure erhält. Dass auch die organisch gebundene Phosphorsäure auf diese Weise entsteht, erscheint zweifelhaft in Anbetracht der beiden letzten Versuche. Da dort eine phosphathaltige, also eine vollkommene, Nährlösung vergoren wurde, blieben die meisten Hefezellen am Leben. Die Gesamtphosphorsäure war deshalb auch durch die Gärung nicht nur nicht vermehrt, sondern sogar bedeutend verringert worden. Dieser Teil wurde eben zur Neubildung von Hefezellen verwendet. Unter der Gesamtphosphorsäure fand sich aber auch hier am Schluss des Versuches eine bestimmte Menge, die sich der Fällung mit Magnesiamixtur entzog und also als organisch gebunden bezeichnet werden musste. Darum scheint es wahrscheinlich, dass die in Lösung gegangene organische Phosphorsäure nicht aus den toten Zellen stammt, sondern ein Stoffwechselprodukt der lebenden Materie vorstellt, das je nach den Bedingungen in kleinerer oder grösserer Quantität in die gärende Flüssigkeit ausgeschieden wird. Zu berücksichtigen wäre höchstens noch die Annahme, dass durch eine synthetisierende Kraft der Hefe aus anorganischer Phosphorsäure und Zucker Glukophosphorsäuren entstehen, eine Tatsache, die von Harden und Joung für Hefepressaft bereits nachgewiesen wurde, wovon früher schon die Rede war. Wollte man unter Berücksichtigung dieser Eigenschaft bei der Hefe sie als Grund für die Bildung organischer Phosphate anführen, so müsste man bei den Gärungen in phosphatfreien Lösungen die aus den toten Hefen selbst stammende anorganische Phosphorsäure mit dem noch vorhandenen Zucker in Reaktion tretend sich vorstellen. Diese Hypothese hat schon ob ihrer vielen Voraussetzungen wenig für sich, wozu noch der Punkt kommt, dass dann jedenfalls in Lösungen, welche von vornherein Phosphate enthalten, bei der Gärung mehr organische Phosphorverbindungen entstehen müssten als in den anderen. Dieses findet aber bei obigen Versuchen keine Bestätigung, sondern das Verhältnis ist gerade ein umgekehrtes.

Nach diesen einleitenden Vorversuchen, die uns die Phosphorsäureverhältnisse bei der Cärung in verschiedensten Lösungen klarlegten, konnte man zur Bierwürze selbst übergehen. Hier lagen die Verhältnisse nur insofern verschieden, als, wie es sich bald zeigte, von Anfang an organische Phosphate vorhanden waren.

Die anorganischen und organischen Phosphate in der Würze und ihr Verhalten während der Gärung.

Zu allen diesen Untersuchungen wurden stets gehopfte, klar filtrierte Bierwürzen verwendet, die dem praktischen Betrieb entnommen waren. Die Ermittlung der einzelnen Phosphorsäuregruppen geschah nach dem bewährten Verfahren wie beim Bier. Da aber in der Würze der Extraktgehalt ungefähr das Doppelte beträgt, während die Phosphorsäuremenge auf Volumenprozente berechnet den gleichen Betrag wie beim Bier ausmacht, so wurde durch einen Versuch studiert, ob auch bei dieser stärkeren Konzentration an Zucker sich die

anorganischen Phosphate vollkommen durch Magnesiamixtur ausfällen lassen. Zu diesem Zwecke wurde einmal die Würze auf das doppelte Volumen verdünnt und dann die mixturfällbare Phosphorsäure bestimmt, während in einer anderen Probe derselben Würze in der gleichen Menge eine direkte Fällung vorgenommen wurde.

a. Genau 100 cc Würze verdünnte man mit Wasser auf 200 cc, versetzte mit Ammoniak und Magnesiamixtur und bestimmte die Phosphorsäure im entstandenen Niederschlag. Die 1. Probe ergab 0,0730 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0732 g $_2P_5O$.

b. 100 cc derselben Würze wurden direkt mit Magnesiamixtur versetzt. Die 1. Probe ergab 0,0736 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0736 g P_2O_5.

Auch durch den grösseren Extraktgehalt der Würze (12,5 Grad Balling) wird von der anorganischen Phosphorsäure nichts zurückgehalten.

Es wurden nun einige Würzen analysiert und das Verhältnis der einzelnen Phosphorsäuren zu einander während der Gärung beobachtet.

1. Gärversuch.

Vor dem Anstellen mit Hefe wurde die Würze selbst einer exakten Analyse unterworfen.

A. Würzenanalyse.

1. Die Gesamtphosphorsäure wurde durch Veraschen von zweimal je 50 cc Substanz mit MgO und HCl bestimmt Das Resultat berechnete man auf 100 cc. Die 1. Probe ergab 0,0878 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0875 g P_2O_5. Als Mittel **0,0877** g P_2O_5 in 100 cc.

2. Die anorganische Phosphorsäure ermittelte man durch Fällen mit Magnesiamixtur. Die 1. Probe ergab 0,0736 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0736 g P_2O_5. Als Mittel **0,0736** g P_2O_5 in 100 cc = **83,92** % der ges. P_2O_5.

3. Die organische Phosphorsäure berechnet sich daraus zu 0,0141 g P_2O_5 = **16,08** % der ges. P_2O_5.

4. Das Verhältnis von anorganischer zu organischer Phosphorsäure ergibt $V\frac{a}{o}$ = **5,220.**

B. Gärung mit 0,6% Hefe bei 17,5°.

Diese Würze wurde mit Bier-Presshefe versetzt — 0,6% auf das Volumen der zu vergärenden Flüssigkeit berechnet — und 7 Tage lang bei gewöhnlicher Temperatur gären gelassen. Dann filtrierte man klar von der Hefe ab ohne nachzuwaschen. Die Analyse lieferte folgende Werte.

1. Die Gesamtphosphorsäure durch Veraschung bestimmt. Die 1. Probe ergab 0,0756 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0755 g P_2O_5. Als Mittel **0,0756** g P_2O_5 in 100 cc. Es sind also vergoren 0,0121 g P_2O_5 = **13,80** % der ursprünglichen P_2O_5.

2. Die anorganische Phosphorsäure durch Magnesiamixtur gefällt. Die 1. Probe ergab 0,0605 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0609 g P_2O_5. Als Mittel **0,0607** g P_2O_5 in 100 cc = **80,29** % der ges. P_2O_5.

3. Die organische Phosphorsäure berechnet sich daraus zu 0,0149 g P_2O_5 = **19,71** % der ges. P_2O_5.

4. Das Verhältnis von anorganischer zu organischer Phosphorsäure ergibt $V\frac{a}{o}$ = **4,074.**

C. Gärung mit 3% Hefe bei 25°.

Von derselben Würze wurde eine andere Portion mit 3% Bier-Presshefe versetzt und im Brutschrank bei 25° 4 Tage der Gärung überlassen. Nach der Filtration führte man die üblichen Untersuchungen aus.

1. Die Gesamtphosphorsäure durch Veraschung bestimmt. Die 1. Probe ergab 0,0749 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0749 g P_2O_5. Als Mittel **0,0749** g P_2O_5 in 100 cc. Es sind also vergoren 0,0128 g P_2O_5 = **14,60** % der ursprünglichen P_2O_5

2. Die anorganische Phosphorsäure durch Magnesiamixtur gefällt. Die 1. Probe ergab 0,0580 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0582 g P_2O_5. Als Mittel **0,0581** g P_2O_5 in 100 cc = **77,57** % der ges. P_2O_5.

3. Die organische Phosphorsäure berechnet sich daraus zu 0,0168 g P_2O_5 = **22,43** % der gesamten P_2O_5.

4. Das Verhältnis von anorganischer zu organischer Phosphorsäure ergibt $V\frac{a}{o}$ = **3,458**.

Die durch diese Versuche erhaltenen Zahlen bringt folgende Tabelle.

Art	Gesamte P_2O_5		Anorgan. P_2O_5		Organische P_2O_5		$V\frac{a}{o}$
	Menge in 100 cc	Abnahme auf Würze	Menge und Prozent der ges. P_2O_5	Abnahme auf Würze	Menge und Prozent der ges. P_2O_5	Zunahme auf Würze	
A. Würze unvergoren	0,0877 g	—	0,0736 g	—	0,0141 g	—	**5,220**
		—	**83,92** %	—	**16,08** %	—	
B. Gärung mit 0,6 % Hefe b. 17,5°	0,0756 g	0,0121 g	0,0607 g	0,0129 g	0,0149 g	0,0008 g	**4,074**
		13,80 %	**80,29** %	**17,53** %	**19,71** %	**5,67** %	
C. Gärung mit 3 % Hefe bei 25°	0,0749 g	0,0128 g	0,0581 g	0,0155 g	0,0168 g	0,0027 g	**3,458**
		14,60 %	**77,57** %	**21,06** %	**22,43** %	**19,15** %	

Man findet also auch in der Würze einen bestimmten Gehalt an organischer Phosphorsäure, der prozentual dem des Bieres etwas nachsteht. Bei der Gärung bleiben diese organischen Phosphate nicht nur vollkommen in Takt, sondern sie erfahren sogar noch eine kleine Mehrung durch von der lebenden Hefenzelle abgeschiedene Stoffwechselprodukte. Die anorganische Phosphorsäure dagegen wird von der Hefe zum Wachstum verbraucht und hat deshalb eine geringe Abnahme zu verzeichnen. Durch diese Prozesse nähern wir uns wieder den Verhältnissen beim Bier. Auch stehen diese Vorgänge vollkommen im Einklang mit den bei den Vorversuchen gewonnenen Resultaten.

Diese Ergebnisse wurden in einem zweiten Versuch kontrolliert und zwar mit einer anderen Würze. Daran knüpften wir folgendes Experiment. Da die Hefe nach unseren bisherigen Erfahrungen die anorganischen Phosphate als Nahrung bevorzugt, so ist es unter Umständen möglich diese gänzlich fortzuschaffen. Man versetzte deshalb zu Ende vergorene Würzen nach Entfernung der alten Hefe mehrere Male mit neuen Mengen Zucker, Asparagin und etwas Kalksalzen und leitete mit frischer Hefe neue Gärungen ein.

2. Gärversuch.

Diese Untersuchungen wurden in der gleichen Weise wie vorher durchgeführt.

A. Würzenanalyse.

1. Die Gesamtphosphorsäure wurde durch Veraschung von zweimal je 50 cc Substanz bestimmt. Die Resultate berechnete man auf 100 cc. Die 1. Probe ergab 0,0980 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0972 g P_2O_5. Als Mittel **0,0976** g P_2O_5 in 100 cc.

2. Die anorganische Phosphorsäure ermittelte man durch Fällen mit Magnesiamixtur. Die 1. Probe ergab 0,0813 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0813 g P_2O_5. Als Mittel **0,0813** g P_2O_5 in 100 cc = **83,30** % der ges. P_2O_5.

3. Die organische Phosphorsäure berechnet sich daraus zu 0,0163 g P_2O_5 = **16,70** % der ges. P_2O_5.

4. Das Verhältnis von anorganischer zu organischer Phosphorsäure ergibt $V\frac{a}{o}$ = **4,988.**

B. Gärung mit 0,6 % Hefe bei 25°.

Diese eben untersuchte Würze stellte man mit 0,6 % Hefe an und liess 4 Tage bei 25° die Gärung in Gang. Das klare Filtrat wurde analysiert.

1. Die Gesamtphosphorsäure durch Veraschung bestimmt. Die 1. Probe ergab 0,0884 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0880 g P_2O_5. Als Mittel **0,0882** g P_2O_5 in 100 cc. Es sind also vergoren 0,0094 g P_2O_5 = **9,63** % der ursprüngl. P_2O_5.

2. Die anorganische Phosphorsäure wurde mit Magnesiamixtur gefällt. Die 1. Probe ergab 0,0706 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0710 g P_2O_5. Als Mittel **0,0708** g P_2O_5 in 100 cc = **80,27** % der ges. P_2O_5.

3. Die organische Phosphorsäure berechnet sich daraus zu 0,0174 g P_2O_5 = **19,73** % der ges. P_2O_5.

4. Das Verhältnis von anorganischer zu organischer Phosphorsäure ergibt $V\frac{a}{o}$ = **4,069.**

C (1). Gärung mit 3 % Hefe bei 25°.

Von derselben Würze wurden 1000 cc zu diesem Versuch entnommen. Man vergor diese Menge mit 3 % Hefe 3 Tage lang bei 25° im Brutschrank. Darauf wurde von der Hefe abfiltriert und diese Analysen ausgeführt.

1. Die Gesamtphosphorsäure durch Veraschung bestimmt. Die 1. Probe ergab 0,0844 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0843 g P_2O_5. Als Mittel **0,0844** g P_2O_5 in 100 cc. Es sind also vergoren 0,0132 g P_2O_5 = **13,52** % der ursprüngl. P_2O_5.

2. Die anorganische Phosphorsäure durch Magnesiamixtur gefällt. Die 1. Probe ergab 0,0671 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0668 g P_2O_5. Als Mittel **0,0669** g P_2O_5 in 100 cc = **79,27** % der ges. P_2O_5.

3. Die organische Phosphorsäure berechnet sich daraus zu 0,0175 g P_2O_5 = **20,73** % der ges. P_2O_5.

4. Das Verhältnis von anorganischer zu organischer Phosphorsäure ergibt $V\frac{a}{o}$ = **3,994.**

C (2). Vom Filtrat der Gärung C (1) wurden genau 600 cc abgemessen und auf dem Wasserbad die Hauptmenge des Alkohols verdampft. Dann gab man 60 g Saccharose, 2,5 g Asparagin und einige Körnchen $CaCl_2$ zu und füllte auf das ursprüngliche Volumen mit Wasser wieder auf. Diese Menge Flüssigkeit stellte man mit 3 % Hefe an und liess 3 Tage lang bei 25° im Brutschrank gären. Hierauf filtrierte man von der Hefe ab ohne nachzuwaschen und behandelte ein abgemessenes Volumen Filtrat in derselben Weise wie eben, indem man den Alkohol abdampfte, 10 % Saccharose, 2,5 g Asparagin und etwas $CaCl_2$ zusetzte, auf das alte Volumen auffüllte und die Gärung ebenso durchführte. Nun ermittelte man im klaren Filtrat wieder die üblichen Werte.

1. Die Gesamtphosphorsäure durch Veraschung bestimmt. Die 1. Probe ergab 0,0660 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0654 g P_2O_5. Als Mittel **0,0657** g P_2O_5 in 100 cc. Es sind also vergoren von der in der Würze anfangs vorhanden gewesenen Phosphorsäure 0,0319 g P_2O_5 = **32,69** % der urspr. P_2O_5.

2. Die anorganische Phosphorsäure durch Magnesiamixtur gefällt. Die 1. Probe ergab 0,0463 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0463 g P_2O_5. Als Mittel **0,0463** g P_2O_5 in 100 cc = **70,47** % der ges. P_2O_5.

4. Die organische Phosphorsäure berechnet sich daraus zu 0,0194 g P_2O_5 = **29,53** % der ges. P_2O_5.

4. Das Verhältnis von anorganischer zu organischer Phosphorsäure ergibt $V\frac{a}{o}$ = **2,387.**

C (3). Der Rest des Filtrates von Gärung C (2) wurde nochmals weiter vergoren und zwar insgesamt mit 40 % Saccharose. Die Ausführung war die gleiche wie vorher, nur dass diesmal stets 20 % Zucker zugleich zugegeben, der Alkohol verdampft und die anderen Operationen durchgeführt wurden. Auch liess man die Gärung beidesmal statt 3 Tage die doppelte Zeit bei 25° im Brutschrank. Die Analyse ergab folgende Werte.

1. Die Gesamtphosphorsäure durch Veraschung bestimmt. Die 1. Probe ergab 0,0557 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0550 g P_2O_5. Als Mittel **0,0554** g P_2O_5 in 100 cc. Es sind also vergoren von der in der Würze anfangs vorhanden gewesenen Phosphorsäure 0,0422 g P_2O_5 = **43,24** % der urspr. P_2O_5.

2. Die anorganische Phosphorsäure durch Magnesiamixtur gefällt. Die 1. Probe ergab 0,0354 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0350 g P_2O_5. Als Mittel **0,0352** g P_2O_5 in 100 cc = **63,54** % der ges. P_2O_5.

3. Die organische Phosphorsäure berechnet sich daraus zu 0,0202 g P_2O_5 = **36,46** % der ges. P_2O_5.

4. Das Verhältnis von anorganischer zu organischer Phosphorsäure ergibt $V\frac{a}{o}$ = **1,743.**

Die durch diese Versuche erhaltenen Resultate wurden in einer Tabelle vereinigt.

Art	Gesamte P_2O_5		Anorgan. P_2O_5		Organische P_2O_5		$V\frac{a}{o}$
	Menge in 100 cc	Abnahme auf Würze	Menge und Prozent der ges. P_2O_5	Abnahme auf Würze	Menge und Prozent der ges. P_2O_5	Zunahme auf Würze	
A. Würze unvergoren	0,0976 g	—	0,0813 g	—	0,0163 g	—	**4,988**
		—	**83,30** %	—	**16,70** %	—	
B. Gärung mit 0,6 % Hefe	0,0882 g	0,0094 g	0,0708 g	0,0105 g	0,0174 g	0,0011 g	**4,069**
		9,63 %	**80,27** %	**12,92** %	**19,73** %	**6,75** %	
C (1). Gärung mit 3 % Hefe	0,0844 g	0,0132 g	0,0669 g	0,0144 g	0,0175 g	0,0012 g	**3,994**
		13,52 %	**79,27** %	**17,71** %	**20,73** %	**7,36** %	
C (2) Gärung	0,0657 g	0,0319 g	0,0463 g	0,0350 g	0,0194 g	0,0031 g	**2,387**
		32,69 %	**70,47** %	**43,05** %	**29,53** %	**19,02** %	
C (3). Gärung	0,0554 g	0,0422 g	0,0352 g	0,0461 g	0,0202 g	0,0039 g	**1,743**
		43,24 %	**63,54** %	**56,70** %	**36,46** %	**23,93** %	

Es zeigt sich hier vollkommene Übereinstimmung mit den Ergebnissen des ersten Gärversuches. Der höhere Gehalt an anorganischer Phosphorsäure der Würze gegenüber dem Bier verringerte sich durch die Gärung und da wie dort bei der grösseren Hefemenge in stärkerem Masse.

Die beiden letzten Gärungen haben das ergeben, was wir bezwecken wollten. Der Gehalt an anorganischen Phosphaten ist um einen bedeutenden Wert gesunken; zwar ein gänzliches Verschwinden desselben liess sich nicht durchführen, wenn es auch theoretisch möglich erscheint; denn es hat sich bei allen bisherigen Versuchen gezeigt, dass die Hefezelle zu ihrer Nahrung und ihrem Wachstum nur anorganische Phosphate zu verwenden vermag, während etwas organische Phosphorsäure ausgeschieden wird.

Alle diese Gärversuche waren bei Bedingungen ausgeführt, die denen der Praxis nicht gleich kamen. Es differierte die Hefemenge, die Temperatur und die Gärdauer. Darum führte man eine Gärung durch, die sich genau an die Praxis anlehnte.

3. Gärversuch aus der Praxis.

Um möglichst genau unter den Bedingungen, wie sie im Brauereibetrieb eingehalten werden, zu arbeiten, wurden die Gärproben in den verschiedenen Stadien der Praxis selbst entnommen. Aus dem nämlichen Gärbottich bekamen wir zu den angegeben Zeiten die Proben, welche sofort von Hefe befreit und der üblichen Analyse unterworfen wurden.

A. Würzenanalyse vor dem Anstellen.

1. Die Gesamtphosphorsäure durch Veraschung bestimmt. Die 1. Probe ergab 0,0944 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0939 g P_2O_5. Als Mittel **0,0941** g P_2O_5 in 100 cc.

2. Die anorganische Phosphorsäure durch Magnesiumixtur gefällt. Die 1. Probe ergab 0,0777 g, die 2. Probe ergab 0,0774 g P_2O_5. Als Mittel **0,0775** g P_2O_5 in 100 cc = **82,36** % der ges. P_2O_5.

3. Die organische Phosphorsäure berechnet sich daraus zu 0,0166 P_2O_5 = **17,64** % der ges. P_2O_5.

4. Das Verhältniss von anorganischer zu organischer Phosphorsäure ergibt $V\frac{a}{o} = \mathbf{4,669}$.

B. Würzenanalyse direkt nach dem Anstellen.

Da beim Zugeben des Zeugs eine Verdünnung der Würze eintritt und auch das Wasser, in welchem die Hefe suspendiert ist, Phosphate enthält und damit irgend eine Verschiebung des Phosphorsäureverhältnisses der Würze bewirken kann, so wurde eine Untersuchung sofort nach Beimischung der Hefe ausgeführt.

1. Die Gesamtphosphorsäure durch Veraschung bestimmt. Die 1. Probe ergab 0,0932 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0930 g P_2O_5. Als Mittel **0,0931** g P_2O_5 in 100 cc. Die Abnahme beträgt also 0,0010 g P_2O_5 = **1,06** % der urspr. P_2O_5.

2. Die anorganische Phosphorsäure durch Magnesiamixtur gefällt. Die 1. Probe ergab 0,0756 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0755 g P_2O_5. Als Mittei **0,0756** g P_2O_5 in 100 cc = **81,20** % der ges. P_2O_5.

3. Die organische Phosphorsäure berechnet sich daraus zu 0,0175 g P_2O_5 = **18,80** % der ges. P_2O_5.

4. Das Verhältnis von anorganischer zu organischer Phosphorsäure ergibt $V\frac{a}{o} = \mathbf{4,320.}$

C. Gärung nach 2 Tagen.

Nachdem die Würze 2 Tage gegoren hatte, führte man diese Untersuchung aus.

1. Die Gesamtphosphorsäure durch Veraschung bestimmt. Die 1. Probe ergab 0,0890 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0886 g P_2O_5. Als Mittel **0,0888** g P_2O_5 in 100 cc. Es sind also vergoren 0,0053 g P_2O_5 = **5,63** % der urspr. P_2O_5.

2. Die anorganische Phosphorsäure durch Magnesiamixtur gefällt. Die 1. Probe ergab 0,0720 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0719 g P_2O_5. Als Mittel **0,0719** g P_2O_5 in 100 cc = **80,79** % der ges. P_2O_5.

3. Die organische Phosphorsäure berechnet sich daraus zu 0,0169 g P_2O_5 = **19,03** % der ges. P_2O_5.

4. Das Verhältnis von anorganischer zu organischer Phosphorsäure ergibt $V\frac{a}{o} = \mathbf{4,254.}$

D. Gärung nach 4 Tagen.

Nach weiteren 2 Tagen der Gärung wurde wieder eine Probe entnommen, welche diese Resultate lieferte.

1. Die Gesamtphosphorsäure durch Veraschung bestimmt. Die 1. Probe ergab 0,0850 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0850 g P_2O_5. Als Mittel **0,0850** g P_2O_5 in 100 cc. Es sind also vergoren 0,0091 g P_2O_5 = **9,67** % der urspr. P_2O_5.

2. Die anorganische Phosphorsäure durch Magnesiamixtur gefällt. Die 1. Probe ergab 0,0688 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0683 g P_2O_5. Als Mittel **0,0686** g P_2O_5 in 100 cc = **80,70** % der ges. P_2O_5.

3. Die organische Phosphorsäure berechnet sich daraus zu 0,0164 g P_2O_5 = **19,30** der ges. P_2O_5.

4. Das Verhältnis von anorganischer zu organischer Phosphorsäure ergibt $V\frac{a}{o} = \mathbf{4,183.}$

E. Gärung nach 6,5 Tagen.

Kurz vor dem Fassen des jungen Bieres nach einer Gärung von 6½ Tagen führte man diese Untersuchung aus.

1. Die Gesamtphosphorsäure durch Veraschung bestimmt. Die 1. Probe ergab 0,0848 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0847 g P_2O_5. Als Mittel **0,0848** g P_2O_5 in 100 cc. Es sind also vergoren 0,0093 g P_2O_5 = **9,88** % der urspr. P_2O_5.

2. Die anorganische Phosphorsäure durch Magnesiamixtur gefällt. Die 1. Probe ergab 0,0688 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0685 g P_2O_5. Als Mittel **0,0686** g P_2O_5 in 100 cc = **80,89** % der ges. P_2O_5.

3. Die organische Phosphorsäure berechnet sich daraus zu 0,0162 g P_2O_5 = **19,11** % der ges. P_2O_5.

4. Das Verhältnis von anorganischer zu organischer Phosphorsäure ergibt $V\frac{a}{o} = \mathbf{4,234.}$

F. Jungbier nach einmonatlicher Lagerung.

Die zu Ende vergorene Würze liess man bei 6—8° einen Monat lang lagern, nachdem die Hefe entfernt war. Nach dieser Zeit ermittelte man die üblichen Werte durch Analyse.

1. Die Gesamtphosphorsäure durch Veraschung bestimmt. Die 1. Probe ergab 0,0848 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0848 g P_2O_5. Das Mittel **0,0848** g P_2O_5 in 100 cc. Es sind also vergoren 0,0093 g P_2O_5 = **9,88** % der urspr. P_2O_5.

2. Die anorganische Phosphorsäure durch Magnesiamixtur gefällt. Die 1. Probe ergab 0,0687 g P_2O_5, die 2. Probe ergab 0,0682 g P_2O_5. Als Mittel **0,0684** g P_2O_5 in 100 cc = **80,66** % der ges. P_2O_5.

3. Die organische Phosphorsäure berechnet sich daraus zu 0,0164 g P_2O_5 = **19,34** % der ges. P_2O_5.

4. Das Verhältnis von anorganischer zu organischer Phosphorsäure ergibt $V\frac{a}{o}$ = **4,171.**

Diese Resultate wurden in einer Tabelle zusammengestellt.

Art	Gesamte P_2O_5		Anorgan. P_2O_5		Organische P_2O_5		$V\frac{a}{o}$
	Menge in 100 cc	Abnahme auf Würze	Menge und Prozent der ges. P_2O_5	Abnahme auf Würze	Menge und Prozent der ges. P_2O_5	Differenz[1]) auf Würze	
Würze unvergoren	0,0941 g	—	0,0775 g	—	0,0166 g	—	**4,669**
		—	**82,36** %	—	**17,64** %	—	
Würze nach dem Anstellen	0,0931 g	0,0010 g	0,0756 g	0,0019 g	0,0175 g	+0,0009 g	**4,320**
		1,06 %	**81,20** %	**2,45** %	**18,80** %	**+5,42** %	
Gärung nach 2 Tagen	0,0888 g	0,0053 g	0,0719 g	0,0056 g	0,0169 g	+0,0003 g	**4,254**
		5,63 %	**80,97** %	**7,23** %	**19,03** %	**+1,81** %	
Gärung nach 4 Tagen	0,0850 g	0,0091 g	0,0686 g	0,0089 g	0,0164 g	−0,0002 g	**4,183**
		9,67 %	**80,70** %	**11,48** %	**19,30** %	**−1,20** %	
Gärung nach 6½ Tagen	0,0848 g	0,0093 g	0,0686 g	0,0089 g	0,0162 g	−0,0004 g	**4,234**
		9,88 %	**80,89** %	**11,48** %	**19,11** %	**−2,41** %	
Jungbier nach einmonatlicher Lagerung	0,0848 g	0,0093 g	0,0684 g	0,0091 g	0,0164 g	−0,0002 g	**4,171**
		9,88 %	**80,66** %	**11,74** %	**19,34** %	**−1,20** %	

[1]) „+" bedeutet Zunahme; „—" bedeutet Abnahme.

Im Prinzip hat die Gärung aus der Praxis Resultate geliefert, wie sie nach den Laboratoriumsversuchen zu erwarten waren. Es geht nur die Verschiebung des Verhältnisses von anorganischer zu organischer Phosphorsäure sowie die Abnahme der Gesamtphosphorsäure viel langsamer vor sich und nicht in dem Masse wie früher. Dies liegt an den geringeren Hefenmengen, mit denen in der Praxis gearbeitet wird, und an der niederen Gärtemperatur (+ 6°), die für das Wachstum der Hefe nicht das Optimum bedeutet. Die zweite Würzenprobe, welche sofort nach Zugabe von Zeug zur Würze entnommen war, gab wegen der mit der Hefe in die Würze gelangenden Wassermenge eine scheinbare Abnahme

der Gesamtphosphorsäure. Ebenso ist es wahrscheinlich auch auf Kosten dieser Flüssigkeitsquantität zu setzen, dass die organischen Phosphate dabei eine kleine Zunahme erfuhren; denn wir haben es hier mit einer Hefe zu tun, welche schon des öfteren zu Gärungen verwendet wurde und, obwohl sie zwischen jedesmaligem Gebrauch sorgfältig gewaschen wird, doch noch geringe Mengen zurückhält, die sie dann beim Lagern im Wasser langsam vergärt. Auf diese Weise bilden sich, wie schon oft gezeigt wurde, organische Phosphate, welche mit dem Hefenwasser in die Würze gelangen. Dass die organische Phosphorsäure bei den anderen Proben teils eine Ab- teils eine Zunahme zu verzeichnen hat, rührt wohl von Analysenfehlern her, da es sich hier um so minimale Mengen handelt, die kaum mehr mit Sicherheit bestimmt werden können. Bei der Lagerung des Bieres ändert sich das Phosphorsäureverhältnis nur in ganz geringem Masse, aber im selben Sinne wie bei der Gärung. Also auch bei der Gärung im Brauereibetriebe verzehrt die Hefe allein die anorganische Phosphorsäure und zwar in einer Menge von 10% auf Gesamtphosphorsäure berechnet. Es genügt also nicht durch Bestimmung der Gesamtphosphorsäure einer Würze zu ermitteln, ob für die Hefe genügend von diesem Nährsalz vorhanden ist, sondern nur die anorganischen Phosphate geben ein Mass hierfür. Dabei bleibt die Frage offen, ob nicht im Notfall bei Abwesenheit anorganischer Phosphate die Hefe befähigt ist sich der organischen Phosphorverbindungen als Nahrung zu bedienen.

Zusammenfassung.

Auch die Würze enthält neben anorganischen organische Phosphate und zwar in einem ähnlichen Verhältnis wie im Bier. Ein kleines Mehr an anorganischer und gesamter Phosphorsäure wird von der Hefe bei der Gärung und Lagerung ausgeglichen. Bei der Gärung in der Praxis bleibt die absolute Menge der organisch gebundenen Phosphate gleich, während bei einer bei höherer Temperatur mit mehr Hefe durchgeführten Gärung eine Zunahme zu verzeichnen ist, da die Hefe bei reger Lebenstätigkeit organische Phosphate als Stoffwechselprodukte abgibt. Zur Nahrung dient der Hefenzelle bloss anorganische Phosphorsäure.

IV. Untersuchungen über die Phosphorsäureverhältnisse in Gerste, Malz und Wurzelkeimen.

Da zur Zeit über die Natur der Phospate in Gerste und Malz so überaus verschiedene Meinungen herrschen, wurde es unternommen auch hier die diesbezüglichen Verhältnisse zu untersuchen. Dabei wurde der strittige Punkt besonders im Auge behalten: „Enthält die Gerste anorganische Phosphorsäure oder nicht?!“ Die in der Einleitung dieser Arbeit erwähnten Abhandlungen von Weiss, Windisch-Vogelsang und Stutzer sind es in erster Linie, welche sich mit dieser Frage beschäftigen. Letztere Forscher nehmen an, dass alle bei der Extraktion der Gerste in Lösung gehende anorganische Phosphorsäure erst durch enzymatische Prozesse freigemacht werde und ursrünglich also nur organische Phosphate vorhanden seien. Demgegenüber weist Weiss nach, dass Gerste schon von vornherein einen Teil ihrer Phosphorsäure in anorganischer Form enthalte und zwar an Natrium und Kalium gebunden, während

die an Magnesium und Calcium gebundenen Phosphate tatsächlich als durch Spaltung aus organischen Komplexen entstanden gedacht werden müssten. Der Grund dieser widersprechenden Resultate liegt zweifelsohne an der verschiedenen Arbeitsweise der genannten Forscher.

In erster Linie sind es die Fällungsmethoden, welche stark differierten. Windisch-Vogelsang bestimmten die Phosphorsäure nach E. Schulze und N. Castoro, Zeitschr. für physiologische Chemie 1901 Bd. XLI, 477, wonach sich die Ausführung kurz folgendermassen gestaltet Das Prinzip dieses Verfahrens beruht darauf, dass frisch gefälltes Di- und Tricalciumphosphat in neutraler Ammoncitratlösung löslich ist und daraus die Phosphorsäure durch Magnesiamixtur ausgefällt werden kann. Die mit Ammoniak und $CaCl_2$ gefällte Phosphorsäure wird abfiltriert, mit heissem Wasser ausgewaschen und der Niederschlag samt dem Filter mit einer neutralen 10%igen Ammoncitratlösung bei gewöhnlicher Temperatur digeriert. Nach 24 Stunden fällt man im Filtrat mit Magnesiumixtur und wägt den Niederschlag als $Mg_2P_2O_7$. Bei dieser Behandlung mit Ammoniumcitrat bleibt aber etwa vorhandenes Ammoniummagnesiumphosphat, welches durch Ammoniak ebenfalls aus dem Gerstenextrakt zur Abscheidung kommt, ungelöst und entzieht sich so der Bestimmung; und diese an Magnesium gebundene anorganische Phosphorsäure beträgt nach Weiss oft mehr als die Hälfte der anorganischen Phosphate.

Von demselben Gedanken geleitet hat Stutzer, Biochemische Zeitschr. Bd. VII 471, vergleichende Versuche nach der Methode Schulze-Castoro und nach seiner Methode ausgeführt und die gewonnenen Resultate tabellarisch zusammengestellt. Stutzer löste den mit Ammoniak und $CaCl_2$ erzeugten Niederschlag mit verdünnter HNO_3 und fällte dann das Phosphat mit Molybdänlösung. Er findet so weit höhere Werte, was ja mit unserer Vermutung vollkommen in Einklang steht.

Verfahren	Gerstenextrakt	Roggenkörner	Kartoffelknollen
Stutzer	0,119 g	0,032 g	0,12 g
Schulze-Castoro	0,091 g	0,003 g	0,10 g

Die Differenz ist also auf Rechnung des Magnesiumphosphats zu setzen.

Weiss (l. c.) endlich bestimmt die gesamtanorganische Phosphorsäure in den Gerstenextrakten durch direkte Fällung mit Magnesiumixtur, respektive er scheidet die an Erdalkalien gebundene mit Ammoniak und im Filtrat durch Magnesiamixtur die an Alkalien gebundene Phosphorsäure aus. Diese Niederschläge werden wieder aufgelöst und nach Woy als Molybdat gewogen.

Ein weiterer wesentlicher Unterschied bei den Untersuchungen genannter Forscher besteht in den zur Enzymtötung verwendeten Mitteln. Weiss, Windisch-Vogelsang und auch Stutzer waren sich klar, dass mit einfachen wässerigen Gerstenextraktionen keine einwandfreien Resultate sich erzielen liessen, da durch vorhandene Fermente zum Teil aus den organischen Phosphorverbindungen anorganische Phosphorsäure hydrolytisch abgespalten wird. Es handelt sich dabei vor allem um Phytin, welches durch die Phytase sich zerlegen lässt. Es müssen deshalb bei oder besser vor der Extraktion die Enzyme getötet werden.

Windisch-Vogelsang verwendeten eine 1% konz. HCl-Lösung zur Extraktion oder trugen das fein zerkleinerte Material in heisses Wasser ein oder kochten

Malz 2 Stunden am Rückflusskühler mit absolutem Alkohol aus, trockneten und extrahierten dann mit Wasser. Stutzer teigte Gerste bei gewöhnlicher Temperatur mit 96% Alkohol ein und zog sie dann ohne den Alkohol zu beseitigen ebenfalls mit 1% HCl-Lösung aus. Weiss verwendete nur die enzymtötende Wirkung des Alkohols, indem er seine Substanz ½ Stunde mit siedendem Alkohol behandelte, scharf trocknete und nun erst das nochmals gepulverte Material der Extraktion mit Wasser unterwarf.

Neben diesen beiden Punkten üben noch zwei wichtige Faktoren einen Einfluss auf die Resultate aus, die Extraktionsdauer und das Verhältnis des extrahierenden Flüssigkeitquantums zur angewandten Menge Substanz. Dass die Extraktionsdauer bei Auszügen mit reinem Wasser von wesentlichem Einfluss ist, war von vornherein anzunehmen, da ja enzymatische Prozesse meist langsam verlaufen und in längerer Zeit auch mehr organische Komplexe in ihre Komponenten gespalten werden können. Dies zeigte Weiss experimentell und setzte eine 18-stündige Extraktionsdauer als genügendes Maximum für seine Versuche fest. Bei den Auszügen unter Hintanhaltung von Fermentwirkungen spielt die Extraktionsdauer keine grosse Rolle, da man annehmen darf, dass die anorganische Phosphorsäure, um die es sich vor allem handelt, schon nach kurzer Zeit aus dem feinst gemahlenen Material in das Lösungsmittel übergeht. Trotzdem blieb Weiss auch hier bei seinen 18 Stunden, während Windisch-Vogelsang teils eine 2- teils eine 24-stündige Extraktionsdauer einhielten. Stutzer hält die Mitte mit 3—4 Stunden.

Über das anzuwendende Konzentrationsverhältnis von Substanz zur extrahierenden Flüssigkeit liegen ebenfalls Untersuchungen von Weiss vor. Er sowie die anderen setzten ihre Auszüge stets im Verhältnis von 1 Teil Material zu 10 Teilen Lösung an. Extraktionen mit Gemischen von 1 : 20 und 1 : 5 hatten übrigens für gleiche Zeiten fast vollständig gleiche Resultate.

Die Variation der Temperatur ist an und für sich etwas beschränkt, da die Stärke bald zu verkleistern beginnt. Windisch-Vogelsang arbeiteten bei 5,5° C, Weiss bei 15 – 20° C. Ausserdem wurden noch Maischen bei höheren Temperaturen ausgeführt.

Bei dieser Menge von Versuchsbedingungen ist die Verschiedenheit der Resultate begreiflich. Wollte man die Phosphorsäureverhältnisse der Gerste und des Malzes mit absoluter Genauigkeit zahlenmässig festlegen, so müssten alle diese einzelnen Variabeln genaustens geprüft und kritisiert werden. Auch wäre es dann notwendig zahlreiche Analysen durchzuführen, um sich einen Überblick über alle Möglichkeiten zu verschaffen. Doch darum war es uns nicht zu tun. Es sollen im vorliegenden Abschnitt durch einige wenige grundlegende Versuche nur die Fragen erörtert werden, welche besonders den Gegenstand der Differenzen bilden.

I. Die Phosphorsäureverhältnisse in der Gerste.

Die Untersuchung der Gerstenextrakte wurde in derselben Weise durchgeführt wie die des Bieres und der Würze. Zur Verwendung gelangte ein auf der Dreefsschen Mühle zur Mehlfeinheit gemahlenes Material. Es kam für alle Versuche nur eine Gerste zur Anwendung, deren Analyse folgende Werte ergab.

Gerstenanalyse.

Wassergehalt: 2,17% auf luftrockener Gerste, 2,50% auf Gerstentrockensubstanz.

Phosphorsäuregehalt: 1,134% auf lufttrockene Gerste, 1,305% auf Gerstentrockensubstanz, 39,74% auf Gerstenasche.

1. Wässrige Extraktion.

40 g dieses Gerstenmehles wurden mit 400 cc. destilliertem Wasser unter öfterem Umschütteln 18 Stunden bei Zimmertemperatur extrahiert. Der klar filtrierte Auszug wurde analysiert und die Ergebnisse hier zusammengestellt.

1. Die gesamtlösliche Phosphorsäure durch Veraschung von 50 cc unter Zusatz von MgO und einigen Tropfen HCl ergab 0,656% P_2O_5 auf lufttrockene Gerste, 0,754% P_2O_5 auf Gerstentrockensubstanz = **57.85%** der Gesamtphosphorsäure der Gerste.

2. Die Erdalkalienphosphorsäure durch Ammoniak gefällt. Der Niederschlag war rein kristallinisch. 0,318% P_2O_5 auf lufttrockene Gerste, 0,366% P_2O_5 auf Gerstentrockensubstanz = **48,48%** d, gesamtlösl. Phosphorsäure = **28,05%** d Gesamtphosphorsäure der Gerste.

3. Die Alkalienphosphorsäure durch Magnesiamixtur im Filtrat der Ammoniakfällung abgeschieden. 0,270% P_2O_5 auf lufttrockene Gerste, 0,311% P_2O_5 auf Gerstentrockensubstanz = **41,16%** d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **23,80%** d. Gesamtphosphorsäure der Gerste.

4. Die gesamtanorganische Phosphorsäure ergibt durch Addition 0,588% P_2O_5 auf lufttrockene Gerste, 0,677% P_2O_5 auf Gerstentrockensubstanz = **89,64%** d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **51,85%** d. Gesamtphosphorsäure der Gerste.

5. Die lösliche organische Phosphorsäure ergibt durch Berechnung 0,068% P_2O_5 auf luftrockene Gerste, 0,077% P_2O_5 auf Gerstentrockensubstanz = **10,36%** d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **6,00%** d. Gesamtphosphorsäure der Gerste.

Diese Resultate stimmen mit denen von Weiss und Windisch-Vogelsang im Prinzip überein, wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist.

Die Werte sind auf Trockensubtanz bezogen.

Untersucht	Ges. P_2O_5	ges. lösl. P_2O_5	Prozent der ges. lösl. P_2O_5			Prozent der ges. P_2O_5		
			Erdalkal.-P_2O_5	Alkalien-P_2O_5	lösl. organ. P_2O_5	Erdalkal.-P_2O_5	Alkalien-P_2O_5	lösl. organ. P_2O_5
Gerste von Weiss	0,967%	0,725 g	0,273 g	0,207 g	0,245 g	0,273 g	0;207 g	0,245 g
		75,1%	**37,7%**	**28,6%**	**33,7%**	**28,3%**	**21,5%**	**25,3%**
Gerste von Windisch-Vogelsang	1,126%	0,694 g	0,562 g		0,132 g	0,562 g		0,132 g
		61,63%	**80,98%**		**19,02%**	**49,91%**		**11,72%**
Unsere Gerste	1,305%	0,754 g	0,366 g	0,311 g	0,077 g	0,366 g	0,311 g	0,077 g
		57,85%	**48,48%**	**41,16%**	**10,36%**	**28,05%**	**23,80%**	**6,00%**

Unsere Gerste enthält etwas weniger wasserlösliche Phosphate im Vergleich zu den anderen, da ihre Gesamtphosphorsäure einen so hohen Betrag ausmacht. Absolut gerechnet ist jener Wert fast genau derselbe. Es scheint also das Plus an Gesamtphosphorsäure aus unlöslichen, unspaltbaren organischen Phosphaten zu bestehen. Die lösliche organische Phosphorsäure hat bei unserer Gerste einen sehr kleinen Wert angenommen. Das Phosphorsäureverhältnis ver-

schiedener Gersten schwankt bei wässrigen Extraktionen ziemlich stark, was zum Teil auch von der Stärke der vorhandenen Enzyme und der Möglichkeit in Reaktion zu treten abhängt.

2. Extraktion mit 1% konz. HCl-Lösung.

Diese Extraktion wurde genau nach den Bestimmungen von Windisch-Vogelsang angesetzt; die Ammoncitratmethode jedoch wendete man zur Fällung nicht an, da man, wie schon vorher gesagt, auf diese Weise falsche Resultate erhält. Die Zugabe von HCl hat den Zweck eine fermentative Hydrolyse zu verhindern. Dabei gerieten die Stärkekörner in einen Quellungszustand, der das Filtrieren äusserst langwierig gestaltete Der Auszug wurde im Verhältnis 1 : 10 angesetzt. Von 2 Versuchen, von denen man den einen 2 Stunden den anderen 15 Stunden einwirken liess, wurde nur der letztere quantitativ untersucht. Der erstere zeigte qualitativ die gleichen Reaktionen.

Windisch-Vogelsang fanden bei ihren Untersuchungen nach dieser Anordnung alle Gerstensorten frei von anorganischen Phosphaten. Deshalb war es erstaunlich, als wir bei dieser Extraktion mit Ammoniak einen starken, phosphorhaltigen Niederschlag erhielten. Doch schon makroskopisch zeigte sich diese Fällung verschieden von den sonst auf diese Weise erhaltenen Ausscheidungen. Sie war schleimig, setzte sich langsam ab und filtrierte schlecht. Unter dem Mikroskop war nicht die geringste Kristallisation wahrnehmbar. Es lag also nicht das gewöhnliche Ammoniummagnesiumphosphat vor. Der Niederschlag wurde zur Untersuchung in kalter, verdünnter Essigsäure gelöst, wobei ein kleiner phosphorfreier Rückstand verblieb, der sich auch in der Hitze nicht löste und sich beim Verbrennen durch den charakteristischen Geruch als Proteinkörper zu erkennen gab. In der schwach essigsauren Lösung liess sich durch Erhitzen eine rein weisse, voluminöse, amorphe Abscheidung erzielen, die beim Abkühlen wieder in Lösung ging. Beim Kochen erschien der Niederschlag von neuem. Dieselbe Ausscheidung konnte man auch durch Zusatz von Ammoniak hervorrufen.

Nach diesen Reaktionen war es nicht schwer den vorliegenden Körper zu identifizieren. Stimmt doch sein ganzes Verhalten mit dem von K. Geys in seiner Dissertation „Beiträge zur chemischen Kenntnis der Gerstenspelzen" erwähnten Phytin überein, das eben von ihm in den Gerstenspelzen nachgewiesen worden war. Beim Vergleich der Eigenschaften unserer Substanz mit denen des käuflichen Phytins ergab sich vollkommene Gleichheit. Zur Sicherheit wurde noch versucht das Spaltungsprodukt des Phytins, den Inosit, direkt nachzuweisen. Zu diesem Zweck muss die Substanz 24 Stunden mit viel konz. H_2SO_4 im Autoklaven mit 6 atm. Druck behandelt werden. Wir begnügten uns mit einer 12-stündigen Einwirkungsdauer. Dann wird verdünnt und mit $BaCO_3$ heiss neutralisiert. Auch hier war die Angabe von Geys bestätigend das $BaSO_4$ auffallenderweise schwach rosa gefärbt. Das Filtrat wurde konzentriert und darin auf Inosit geprüft nach der Scherer'schen Reaktion, Annalen der Chemie 81 375. Sie wird folgendermassen angestellt. Man verdampft die zu untersuchende Lösung im Platinschälchen mit etwas verdünnter HNO_3 bis fast zur Trockene. Hierauf lässt man abkühlen, fügt Ammoniak bis zum deutlichen Geruch und einige Tropfen einer $CaCl_2$-Lösung hinzu. Dieses Gemenge bringt man wieder vorsichtig über freier Flamme zur Trockene; war Inosit vorhanden, so tritt eine charakteristische, rosarote

Färbung auf. Eine Verbesserung dieser Methode veröffentlichte E. Salkowski in Hoppe-Seylers Zeitschr. für physiologische Chemie Bd. 69. S. 478. Er nimmt die fragliche Substanz mit einigen Tropfen verdünnter HNO_3 (sp. G = 1,2) auf und erzeugt mittels Platinchlorid und einem Tropfen 10% $CaCl_2$-Lösung ohne Zusatz von Ammoniak beim Abdampfen zur Trockene eine deutliche rote Färbung. Da wie dort bildet sich Rhodizonsäure (Dioxydichinoyl). Nach beiden Reaktionen gelang es in unserer Lösung Inosit nachzuweisen, den Ammoniakniederschlag also als Phytin mit Sicherheit zu identifizieren.

Geys isolierte das Phytin durch Extrahieren von Gerstenspelzen mit 0,2% HCl-Lösung. Dann ist es leicht erklärlich, dass wir es bei diesem Auszug ebenfalls erhalten haben; denn auch wir verwendeten spelzenhaltiges Material. Doch ist es auch möglich, dass die Gerste im Korn Phytin enthält. Deshalb wurde folgender Versuch angesetzt. 300 g Rollgerste bester Qualität, die man als fast vollkommen frei von Spelze bezeichnen darf, wurden fein gemahlen und mit 1,2 Liter einer 0,1% HCl-Lösung angerührt. Von der stark gequollenen Masse presste man nach 18 Stunden ab und filtrierte möglichst klar. Das Filtrat ergab mit Ammoniak einen Niederschlag, der sich beim Kochen stark vermehrte infolge von Eiweissausscheidung. Durch Übersättigung mit HCl und Erhitzen bis zum Kochen vollendete man die Koagulation und brachte eventuell vorhandenes Phytin wieder in Lösung. Das konzentrierte Filtrat zeigte jedoch auf Zugabe von Ammoniak nur eine so minimale Abscheidung, dass von einer näheren Untersuchung derselben Abstand genommen werden musste. Man kann deshalb das spelzenfreie Gerstenkorn als phytinfrei bezeichnen.

Wir wollen nun die Werte angeben, die wir bei dieser Extraktion erhalten haben. Der durch Ammoniak erzeugte Niederschlag durfte natürlich nicht als anorganische Phosphorsäure gerechnet werden. Dass neben Phytin keine anorganischen Phosphate anwesend waren, ergab sich einerseits aus dem absolut kristallfreien Bild des Niederschlages unter dem Mikroskop andererseits aus dem Fehlen der Erdalkalienphosphorsäure überhaupt bei den folgenden Extraktionen nach erfolgter Enzymtötung, wozu ja auch die Behandlung mit HCl zu rechnen ist.

1. Die gesamtlösliche Phosphorsäure durch Veraschung bestimmt. 0,502% P_2O_5 auf lufttrockene Gerste, 0,578% P_2O_5 auf Gerstentrockensubstanz = **44,27%** der Gesamtphosphorsäure der Gerste.

2. Phytin durch Ammoniak gefällt und im Niederschlag als Phosphorsäure bestimmt.
0,340% P_2O_5 auf lufttrockene Gerste, 0,391% P_2O_5 auf Gerstentrockensubstanz, = **67,73%** d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **29,98%** d. Gesamtphosphorsäure der Gerste.

3. Alkalienphosphorsäure = gesamtanorganische Phosphorsäure. Sie wurde im Filtrat der Phytinbestimmung mit Magnesiamixtur abgeschieden.
0,066% P_2O_5 auf lufttrockene Gerste, 0,076% P_2O_5 auf Gerstentrockensubstanz, = **13,15%** d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **5,82%** d. Gesamtphosphorsäure der Gerste.

4. Die lösliche organische Phosphorsäure unter Miteinrechnung der obigen Phytinwerte ergibt dann
0,436% P_2O_5 auf lufttrockene Gerste, 0,502% P_2O_5 auf Gerstentrockensubstanz = **86,85%** d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **38,45%** d. Gesamtphosphorsäure der Gerste.

Der Phytingehalt der Gerste ist ziemlich hoch; denn, da nach unserer Analyse ihre Phosphorsäure ∽ 0,4% auf Gerstentrockensubtanz ausmacht und der Formel rund 45% P_2O_5 entsprechen, so enthält die Trockensubstanz der Gerste ∽ 0,9% Phytin. Diese Menge wurde bei der wässrigen Extraktion durch die Phytase,

ein Enzym, welches Suzuki und Joshimura, Bull. coll. of Agric. Tokyo 1907. isoliert haben wollen, in anorganische und zwar Erdalkalienphosphorsäure zerlegt. Es entsprechen sich auch die diesbezüglichen Zahlen hier und dort fast genau — auf Gesamtphosphorsäure: 30% gegenüber 28%.

Doch es scheinen auch noch andere Enzyme in der Gerste eine Rolle zu spielen, da im Vergleich zur wässrigen Extraktion sowohl die gesamtlösliche sowie die Alkalienphosphorsäure um einen bedeutenden Wert gesunken ist. Aber ein gewisser Prozentsatz der Gesamtphosphorsäure ist auch hier in anorganischer Form vorhanden und zwar ist er an Alkalien gebunden.

Dass Windisch-Vogelsang nach ihrer Methode brauchbare Resultate erzielten, beruht darauf, dass das durch Ammoniak und $CaCl_2$ ausgefällte Phytin bei der Behandlung mit neutralem Ammoniumcitrat ungelöst blieb und so richtigerweise nicht als anorganische Phosphorsäure mitbestimmt wurde. Natürlich entzog sich ihnen auf der anderen Seite die an Magnesium gebundenen Phosphate, die immerhin einen beträchtlichen Teil ausmachen. Nimmt man aber den durch Ammoniak und $CaCl_2$ erzeugten Niederschlag, wie Stutzer empfiehlt, mit HNO_3 auf und fällt dann mit Molybdän, so scheidet sich das Phytin zum Teil als solches ab und macht das Resultat unbrauchbar.

3. Extraktion nach Stutzer.

Um auch ein Urteil über die Stutzersche Methode zu gewinnen, wurde ein Auszug nach seinen Vorschriften angesetzt. 20 g unserer Gerste durchfeuchtete man mit 20 cc 96% Alkohol, setzte eine Mischung von 20 cc einer Salzsäurelösung, welche 10% HCl enthielt, und 160 cc Wasser zu und extrahierte unter öfterem Schütteln 4 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur. Bei der Untersuchung wurde nicht mit Ammoniak und $CaCl_2$ gearbeitet, sondern nach der uns geläufigen Art. Der Niederschlag mit Ammoniak erwies sich hier wiederum als reines Phytin frei von jeglicher Kristallisation und wird deshalb zur löslichen organischen Phosphorsäure gerechnet.

1. Die gesamtlösliche Phosphorsäure durch Veraschung bestimmt. 0,687% P_2O_5 auf lufttrockene Gerste, 0,790% P_2O_5 auf Gerstentrockensubstanz = **60,59%** der Gesamtphosphorsäure der Gerste.

2. Phytin durch Ammoniak gefällt und im Niederschlag als Phosphorsäure bestimmt.
0,377% P_2O_5 auf lufttrockene Gerste, 0,434% P_2O_5 auf Gerstentrockensubstanz = **54,88%** d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **33,25%** d. Gesamtphosphorsäure der Gerste.

3. Alkalienphosphorsäure = gesamtanorganische Phosphorsäure. Sie wurde im Filtrat der Phytinbestimmung mit Magnesiamixtur abgeschieden.
0,257% P_2O_5 auf lufttrockene Gerste, 0,296% P_2O_5 auf Gerstentrockensubstanz **37,41%** d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **22,66%** d. Gesamtphosphorsäure der Gerste.

4. Die lösliche organische Phosphorsäure unter Miteinrechnung der obigen Phytinwerte ergibt dann
0,430% P_2O_5 auf lufttrockene Gerste, 0,494% P_2O_5 auf Gerstentrockensubstanz = **62,59%** d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **37,93%** d. Gesamtphosporsäure der Gerste.

Da Stutzer keine exakten Gerstenanalysen ausgeführt hat, so ist es leider nicht möglich vergleichende Resultate gegenüberzustellen. Doch es ergibt sich schon aus dieser einzigen Untersuchung, dass wir nach dieser Methode keine richtigen Werte erhalten; denn abgesehen von einer unnatürlichen Zunahme der gesamtlöslichen Phosphorsäure, jedenfalls bedingt durch die an und für sich

zwecklose Zugabe des Alkohols, hat das durch HCl in Lösung gegangene Phytin für die Bestimmung dieselben unangenehmen Folgen, wie wir sie bei der vorigen Extraktion am Ende angeführt haben. Auch der hier für Phytin ermittelte Wert stimmt mit den früheren Resultaten überein.

4. Extraktion nach Weiss.

40 g Gerste wurden in einem Becherglas unter öfterem Umrühren ½ Stunde lang auf dem Wasserbad mit 100 cc 96% Alkohol zum Sieden erhitzt. Nach dem Verdampfen des Alkoholes trocknete man im Trockenschrank bei 105° und extrahierte mit 400 cc destilliertem Wasser 18 Stunden. Mit Ammoniak liess sich hier kein Niederschlag erzeugen.

1. Die gesamtlösliche Phosphorsäure durch Veraschung bestimmt. 0,494% P_2O_5 auf lufttrockene Gerste, 0,568% P_2O_5 auf Gerstentrockensubstanz = **43,75%** der Gesamtphosphorsäure der Gerste,

2. Erdalkalienphosphorsäure nicht vorhanden.

3. Alkalienphosphorsäure = gesamtanorganische Phosphorsäure durch Magnesiamixtur gefällt.
0,444% P_2O_5 auf lufttrockene Gerste, 0,511% P_2O_5 auf Gerstentrockensubstanz = **89,88%** d gesamtlösl. Phosphorsäure = **39,16%** d Gesamtphosphorsäure der Gerste.

4. Die lösliche organische Phosphorsäure ergibt durch Berechnung
0,050% P_2O_5 auf lufttrockene Gerste, 0,057% P_2O_5 auf Gerstentrockensubstanz = **10,12%** d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **4,59%** d. Gesamtphosphorsäure der Gerste.

Es entsprechen diese Resultate vollkommen denen von Weiss besonders was das absolute Fehlen von Erdalkalienphosphorsäure sowie die Abnahme der gesamtlöslichen Phosphate gegenüber dem wässrigen Auszug betrifft.

5. Extraktion nach 6-stündiger Behandlung mit Alkohol.

Von der Annahme ausgehend, dass durch ein ½-stündiges Kochen des Gerstenmaterials mit Alkohol unter Umständen nicht alle Enzyme vollständig vernichtet worden sind, erhitzte man 40 g Gerste 6 Stunden am Rückflusskühler mit 96% Alkohol zum lebhaften Sieden, destillierte den Alkohol ab, trocknete 5 Stunden bei 105° und extrahierte 18 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur mit 400 cc Wasser. Mit Ammoniak erhielt man natürlich auch hier keinen Niederschlag.

1. Die gesamtlösliche Phosphorsäure durch Veraschung bestimmt. 0,244 g P_2O_5 auf lufttrockene Gerste, 0,281% P_2O_5 auf Gerstentrockensubstanz = **21,52%** der Gesamtphosphorsäure der Gerste.

2. Erdalkalienphosphorsäure nicht vorhanden.

3. Alkalienphosphorsäure = gesamtanorganische Phosphorsäure durch Magnesiamixtur gefällt.
0,222% P_2O_5 auf lufttrockene Gerste, 0,255% P_2O_5 auf Gerstentrockensubstanz = **90,98%** d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **19,58%** d. Gesamtphosphorsäure der Gerste.

4. Die lösliche organische Phosphorsäure ergibt durch Berechnung
0,222% P_2O_5 auf lufttrockene Gerste, 0,026% P_2O_5 auf Gerstentrockensubstanz = **9,02%** d gesamtlösl. Phosphorsäure = **1,94%** d. Gesamtphosphorsäure der Gerste.

Durch eine intensivere Behandlung der Gerste mit Alkohol ist es also tatsächlich möglich die enzymatische Hydrolyse noch weiter zu unterdrücken oder, wie man wohl sagen darf, vollkommen auszuschalten. Dabei dient uns als Mass das Sinken des Wertes für gesamtlösliche Phosphorsäure, fast gleichbedeutend mit dem der anorganischen, da ja die löslichen organischen Phosphate nur einen ganz minimalen Betrag davon für sich in Anspruch nehmen. Wir gehen dabei von der Voraussetzung aus, dass die Fermente aus organischen Phosphorkomplexen anorganische Phosphorsäure frei machen und damit die gesamtlösliche Phosphorsäure vermehren, dass also mit der Abnahme der anorganischen und gesamtlöslichen Phosphate eine vollständigere Abtötung der Enzyme parallel laufe; denn an eine Löslichkeitsverminderung der anorganischen Phosphate durch die Alkoholkochung ist nicht zu denken.

6. Extraktion nach Vorbehandlung der Gerste mit trockener Hitze.

Zuletzt versuchte man noch auf einem neuen Wege eine Vernichtung der Fermente herbeizuführen. 40 g Gerste erhitzte man in einem verschlossenen Wägegläschen 6 Stunden auf 105° und dann noch weitere 4 Stunden bei geöffnetem Deckel. Das so behandelte Material wurde wie sonst mit 400 cc Wasser 18 Stunden bei Zimmertemperatur extrahiert. Ammoniak schied auch hier keinen Niederschlag ab. Die Resultate der Analyse sind folgende.

1. Die gesamtlösliche Phosphorsäure durch Veraschung bestimmt. 0,402% P_2O_5 auf lufttrockene Gerste, 0,462% P_2O_5 auf Gerstentrockensubstanz = **35,42%** der Gesamtphosphorsäure der Gerste.

2. Erdalkalienphosphorsäure nicht vorhanden.

3. Alkalienphosphorsäure = gesamtanorganische Phosphorsäure durch Magnesiamixtur gefällt.
0,358% P_2O_5 auf lufttrockene Gerste, 0,412% P_2O_5 auf Gerstentrockensubstanz = **89,05%** d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **31,57%** d. Gesamtphosphorsäure der Gerste.

4. Die lösliche organische Phosphorsäure ergibt durch Berechnung
0,044% P_2O_5 auf lufttrockene Gerste, 0,050% P_2O_5 auf Gerstentrockensubstanz = **10,95%** d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **3,88%** d. Gesamtphosphorsäure der Gerste.

Bezüglich der Wirksamkeit der Enzymtötung hält die Behandlung der Gerste mit trockener Hitze die Mitte zwischen der ½-stündigen und der 6-stündigen Kochung mit Alkohol. Erwähnt sei hier noch, dass eine Gerste, die im offenen Gefäss auf 105° ebenso lang erhitzt worden war, im wässrigen Auszug mit Ammoniak starken Phosphatniederschlag ergab, dass also die Enzyme dadurch nicht vernichtet worden waren.

Zusammenstellung und Ergebnisse.

Die vorliegenden 6 Extraktionsversuche sind zur Übersicht mit ihren wichtigsten Resultaten hier in einer Tabelle zusammengefasst. Während wir die wässrige Extraktion an die Spitze stellen, ordnen wir die anderen Auszüge in aufsteigender Reihe nach der Brauchbarkeit der zur Enzymtötung angewandten Methode.

Die Zahlen verstehen sich auf Prozente der Gesamtphosphorsäure.

Extraktion	ges. lösl. P_2O_5	Erdalkal.-P_2O_5	Alkal.-P_2O_5.	lösl. org. P_2O_5
Mit Wasser	57,85 %	28,05 %	23,80 %	6,00 %
Nach Stutzer	60,59 %	—	22,66 %	37,93 %
Nach Windisch-Vogelsang	44,27 %	—	5,82 %	38,45 %
Nach Weiss	43,75 %	—	39,16 %	4,59 %
Nach Behandlung mit trock. Hitze	35,42 %	—	31,57 %	3,88 %
Nach 6-stündiger Alkoholkochung	21,52 %	—	19,58 %	1,94 %

Auf den ersten Blick zeigt diese Tabelle nur ein wirres Gemenge von Zahlen; denn sie liefert weder ein sytematisches An- oder Absteigen noch nur halbwegs konstante Werte für irgendeine Rubrik. Die Tabelle gewinnt erst dann eine Bedeutung, wenn man von einem absoluten Zahlenergebnis absieht und nur den zu beweisenden Grundgedanken im Auge behält; denn das glauben wir durch unsere Versuche mit Sicherheit festgelegt zu haben:

Welche Mittel wir auch anwenden um eine enzymatische, hydrolytische Spaltung der organischen Phosphorkomplexe bei der Extraktion der Gerste auszuschalten, stets erhalten wir eine gewisse Menge anorganischer Phosphorsäure, die in dieser Form im Korn vorhanden sein muss.

Es wäre auch eine vollständige Abwesenheit derselben kaum natürlich zu erklären, da beim Wachstum anorganische Phosphate stets anwesend sind und wir nicht annehmen können im untersuchten Material eine gerade auf dem absoluten Punkt der Reife sich befindliche Gerste vor uns zu haben. Diese anorganische Phosphorsäure ist nur an Alkalien gebunden, während die bei der wässrigen Extraktion in Lösung gehende Erdalkalienphosphorsäure aus organischen Verbindungen enzymatisch abgespalten gedacht werden muss. Dabei kommt wahrscheinlich nur Phytin in Betracht. Eine Extraktion mit HCl, wie sie Windisch-Vogelsang und Stutzer anwenden, ist bei der Gerste nicht ratsam, da auf diese Weise Phytin mitgelöst wird, obwohl vielleicht sogar dadurch die Enzyme am sichersten getötet werden. Die Gerste enthält nur sehr wenig in Wasser lösliche organische Phosphate; doch müssen jene 40 Prozent der nicht extrahierbaren Phosphate auch als organisch gebunden angesprochen werden. Zur Extraktion der Gerste unter Ausschluss von Fermentwirkungen eignet sich am besten eine Vorbehandlung des Materials mit Alkohol, den man 6 Stunden in der Hitze einwirken lässt.

II. Die Phosphorsäureverhältnisse im Malz.

Obwohl beim Malz die Differenzen zwischen den Arbeiten von Weiss und Windisch-Vogelsang nur unwesentliche Punkte betreffen, wurden doch auch hier einige kritische Untersuchungen ausgeführt.

Die zu obigen Analysen verwendete Gerste wurde zu diesem Zweck vermälzt. Das Weichen geschah mit einer eigens konstruierten Luftwasserweiche, die dem Prinzip in der Praxis folgend dem Laboratoriumsbetrieb für einfache Hilfsmittel angepasst war. Die so behandelte Gerste zeigte ein viel rascheres Wachstum als eine andere nach der sonst üblichen Art geweichte Probe desselben Materials. Das Grünmalz darrte man auf helles Malz 24 Stunden bei einer Abdarrtemperatur von 72 °. Es wurde fein gemahlen und untersucht.

Malzanalyse.

Wassergehalt: 4,06 %.
Aschegehalt: 2,23 % auf lufttrockenes Malz, 2,32 % auf Malztrockensubstanz.
Phosphorsäuregehalt: 0,937 % auf lufttrockenes Malz, 0,977 % auf Malztrockensubstanz, 41,98 % auf Malzasche.

1. Wässrige Extraktion.

20 g des gemahlenen Malzes wurden mit 200 cc destilliertem Wasser unter öfterem Umschütteln 18 Stunden bei Zimmertemperatur extrahiert. Das klare Filtrat wurde analysiert. Der Ammoniakniederschlag war fast rein kristallinisch.

1. Die gesamtlösliche Phosphorsäure durch Veraschung bestimmt.
0,724 % P_2O_5 auf lufttrockenes Malz, 0,755 % P_2O_5 auf Malztrockensubstanz = **77,27** % der Gesamtphosphorsäure des Malzes.

3. Die Erdalkalienphosphorsäure durch Ammoniak gefällt.
0,338 % P_2O_5 auf lufttrockenes Malz, 0;352 % P_2O_5 auf Malztrockensubstanz = **46,69** % d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **36,07** % d. Gesamtphosphorsäure des Malzes.

3. Die Alkalienphosphorsäure durch Magnesiamixtur im Filtrat der Ammoniakfällung abgeschieden.
0,315 % P_2O_5 auf lufttrockenes Malz, 0,328 % P_2O_5 auf Malztrockensubstanz = **43,51** % d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **33,62** % d. Gesamtphosphorsäure des Malzes.

4. Die gesamtanorganische Phosphorsäure ergibt durch Addition
0,653 % P_2O_5 auf lufttrockenes Malz, 0,680 % P_2O_5 auf Malztrockensubstanz = **90,20** % d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **69,69** % d. Gesamtphosphorsäure des Malzes

5. Die lösliche organische Phosphorsäure ergibt durch Berechnung
0,071 % P_2O_5 auf lufttrockenes Malz, 0,075 % P_2O_5 auf Malztrockensubstanz = **9,80** % d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **7,58** % d. Gesamtphosphorsäure des Malzes.

Auch hier zeigt sich Übereinstimmung mit den Resultaten von Weiss und Windisch-Vogelsang, was aus dieser Tabelle ersichtlich wird.

Die Werte sind auf Trockensubstanz bezogen.

Untersucht	Ges. P_2O_5	ges. lösl. P_2O_5	Prozent der ges. lösl. P_2O_5			Prozent der ges. P_2O_5		
			Erdalkal.-P_2O_5	Alkalien-P_2O_5	lösl. organ. P_2O_5	Erdalkal.-P_2O_5	Alkalien-P_2O_5	lösl. organ. P_2O_5
Malz von Weiss	0,841%	0,561 g	0,247 g	0,148 g	0,166 g	0,247 g	0,148 g	0,166 g
		66,7 %	**43,7 %**	**26,4 %**	**29,9 %**	**29,4 %**	**17,6 %**	**19,7 %**
Malz von Windisch-Vogelsang	1,145%	0,800 g	0,747 g		0,053 g	0,747 g		0,053 g
		69,87 %	**93,37 %**		**6,63 %**	**65,24 %**		**4,63 %**
Unser Malz	0,977%	0,755 g	0,352 g	0,328 g	0,075 g	0,352 g	0,328 g	0,075 g
		77,27 %	**46,69 %**	**43,51 %**	**9,80 %**	**36,07 %**	**33,62 %**	**7,58 %**

Über die Veränderung in dem Mengenverhältnis der einzelnen Phosphorsäuregruppen beim Vermälzen der Gerste gibt folgende Zusammenstellung Aufschluss.

Untersucht	ges. P_2O_5	ges. lösl. P_2O_5	Prozent der ges. lösl P_2O_5		
			Erdalkalien-P_2O_5	Alkalien-P_2O_5	lösl. organ. P_2O_5
Gerste	1,305%	0,754 g	0,366 g	0,311 g	0,077 g
		57,85 %	**48,48 %**	**41,16 %**	**10,36 %**
Helles Malz daraus	0,977%	0,755 g	0,352 g	0,328 g	0,075 g
		77,27 %	**46,69 %**	**43,51 %**	**9,80 %**

Im vorliegenden Fall scheint bei der Überführung der Gerste in Malz bloss die unlösliche organische Phosphorsäure zum Teil verbraucht worden zu sein, da sowohl die gesamtlösliche Phosphorsäure sowie die einzelnen Unterarten derselben bei Gerste und Malz fast den gleichen Wert aufweisen. Doch wollen wir das nicht generalisieren, da diese Tatsache bei Weiss nur halbwegs, bei Windisch-Vogelsang keineswegs eine Bestätigung findet.

2. Extraktion mit 1% konz. HCl-Lösung.

Trotzdem wir diese Methode zur enzymfreien Extraktion bei der Gerste als nicht empfehlenswert bezeichnen mussten von wegen des in Lösung gehenden Phytins, so wurde doch auch beim Malz ein solcher Versuch angesetzt gerade um diese Verhältnisse zu untersuchen. Wir behandelten 40 g Malz mit 400 cc HCl-Lösung, welche 1% konz. HCl-Lösung enthielt, und analysierten nach 18-stündiger Einwirkungsdauer das Filtrat. Der Ammoniakniederschlag zeigte makro- wie mikroskopisch die Anwesenheit von Phytin, hatte aber neben-

bei noch eine zahlreiche Menge von Ammoniummagnesiumphosphatkristallen aufzuweisen. Zur Trennung und quantitativen Bestimmung des Phytins und der Erdalkalienphosphorsäure wurde folgender Weg eingeschlagen. 50 cc des Auszuges versetzte man mit Ammoniak, veraschte den Niederschlag, ein Gemenge der Erdalkalienphosphorsäure mit Phytin, Proteinkörpern und Kieselsäure, und ermittelte die Phosphorsäure darin als Summe von Phytin und an Erdalkalien gebundene. In einer 2. Probe von 50 cc wurde der mit Ammoniak erzeugte Niederschlag mit warmer, verdünnter HNO_3 vom Filter gelöst, wobei Protein und SiO_2 zurückblieb. In der Lösung fällte man nach Vorschrift die Phosphorsäure mit Molybdän. Etwas amorphes Phytin schied sich als solches zum Teil dabei ab. Der Niederschlag wurde nach 5-stündigem Stehen abfiltriert, mit Ammoniak gelöst und zur Lösung Magnesiamixtur gegeben. Die weitere Bestimmung geschah nach der Lorenzmethode. Wir erhalten so den Wert für Erdalkalienphosphorsäure und durch Subtraktion von dem Ergebnis der 1. Probe den Gehalt an Phytin.

Die erzielten Resultate sind folgende.

1. Die gesamtlösliche Phosphorsäure durch Veraschung bestimmt.
0,552% P_2O_5 auf lufttrockenes Malz, 0,575% P_2O_5 auf Malztrockensubstanz = **58,91%** der Gesamtphosphorsäure des Malzes.

2. Die Erdalkalienphosphorsäure durch Ammoniak gefällt und vom Phytin getrennt wie angegeben.
0,162% P_2O_5 auf lufttrockenes Malz, 0,169% P_2O_5 auf Malztrockensubstanz = **29,35%** d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **17,29%** d. Gesamtphosphorsäure des Malzes.

3 Phytin durch Ammoniak gefällt und wie angegeben bestimmt.
0,294% P_2O_5 auf lufttrockenes Malz, 0,306% P_2O_5 auf Malztrockensubstanz = **53,26%** d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **31,38%** d, Gesamtphosphorsäure des Malzes.

4. Die Alkalienphosphorsäure durch Magnesiamixtur im Filtrat der Ammoniakfällung ausgeschieden.
0,030% P_2O_5 auf lufttrockenes Malz, 0,031% P_2O_5 auf Malztrockensubstanz = **5,43%** d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **3,20%** d. Gesamtphosphorsäure des Malzes.

5. Die gesamtanorganische Phosphorsäure durch Addition ermittelt.
0,192% P_2O_5 auf lufttrockenes Malz, 0,200% P_2O_5 auf Malztrockensubstanz = **34,78%** d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **20,49%** d. Gesamtphosphorsäure des Malzes.

6. Die lösliche organische Phosphorsäure unter Miteinrechnung obiger Phytinwerte ergibt dann
0,360% P_2O_5 auf lufttrockenes Malz, 0,375% P_2O_5 auf Malztrockensubstanz = **65,22%** d gesamtlösl. Phosphorsäure = **38,42%** d. Gesamtphosphorsäure des Malzes.

Einen bemerkenswerten Unterschied gegenüber dem nach der gleichen Methode erhaltenen Gerstenextrakt bildet hier die Anwesenheit der Erdalkalienphosphorsäure. Wir werden sie um dem Späteren vorauszugreifen auch bei allen anderen enzymfreien Auszügen wiederfinden. Diese Tatsache ist für das Malz charakteristisch, was im Prinzip schon von Windisch-Vogelsang und Weiss festgestellt wurde.

Der Gehalt an Phytin entspricht ungefähr dem der Gerste. Auch für das Malz konnten wir nachweisen, dass das Phytin nur in den Spelzen seinen Sitz hat. Wir stellten uns spelzenfreies Material her, indem wir schwach angefeuchtetes Darrmalz in der Seck-Walzenmühle zerquetschten. Die Spelze lässt sich dann leicht durch Absieben vom Mehlkörper trennen, der noch stärker

zerkleinert wird. 200 g der so vorbereiteten Substanz extrahierte man mit 800 cc einer 0,5% HCl-Lösung 20 Stunden. Nach Abscheidung des Eiweisses durch Koagulation erzielte man mit Ammoniak hier wohl einen starken Niederschlag, der aber fast nur aus Kristallen von Magnesiaphosphaten bestand. Phytin ist also auch im spelzenfreien Malz nicht vorhanden.

3. Extraktion nach 6-stündiger Behandlung mit Alkohol.

30 g Malz kochte man 6 Stunden mit Alkohol am Rückflusskühler, verflüchtigte den Alkohol, trocknete scharf und extrahierte mit 300 cc Wasser 18 Stunden bei Zimmertemperatur.

1. Die gesamtlösliche Phosphorsäure durch Veraschung bestimmt. 0,396% P_2O_5 auf lufttrockenes Malz, 0,413% P_2O_5 auf Malztrockensubstanz = **42,26**% der Gesamtphosphorsäure des Malzes.

2. Die Erdalkalienphosphorsäure durch Ammoniak gefällt. 0,201% P_2O_5 auf lufttrockenes Malz, 0,209% P_2O_5 auf Malztrockensubstanz = **50,76**% d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **21,45**% d. Gesamtphosphorsäure des Malzes.

3. Die Alkalienphosphorsäure im Filtrat der Ammoniakfällung mit Magnesiamixtur abgeschieden. 0,134% P_2O_5 auf lufttrockenes Malz, 0,140% P_2O_5 auf Malztrockensubstanz = **33,84**% d gesamtlösl. Phosphorsäure = **14,30**% d. Gesamtphosphorsäure des Malzes.

4. Die gesamtanorganische Phosphorsäure durch Addition ermittelt. 0,335% P_2O_5 auf lufttrockenes Malz, 0,349% P_2O_5 auf Malztrockensubstanz = **80,60**% d gesamtlösl. Phosphorsäure = **35,75**% d. Gesamtphosphorsäure des Malzes.

5. Die lösliche organische Phosphorsäure durch Berechnung ergibt 0,061% P_2O_5 auf lufttrockenes Malz, 0,064% P_2O_5 auf Malztrockensubstanz = **15,40**% d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **6,51**% d. Gesamtphosphorsäure des Malzes.

Der Wert für Erdalkalienphosphorsäure ist auch hier bedeutend. Ausserdem hat die gesamtlösliche Phosphorsäure eine Abnahme gegenüber der wässrigen Extraktion zu verzeichnen, wodurch bewiesen ist, dass dort enzymatische Spaltungen eine Rolle gespielt haben. Diese Resultate stimmen mit den Befunden von Weiss überein.

4. Extraktion nach dem Kongress-Maischeverfahren.

Von diesem Malz wurden 50 g Feinmehl nach der vorgeschriebenen Methode eingemaischt. Um mit den früheren Werten vergleichbare Resultate zu erhalten stellte man auch hier das Verhältnis 1 : 10 her, indem man nach dem Maischen auf 550 g auffüllte. Im filtrierten Extrakt wurden die üblichen Bestimmungen ausgeführt.

1. Die gesamtlösliche Phosphorsäure durch Veraschung bestimmt. 0,724% P_2O_5 auf lufttrockenes Malz, 0,755% P_2O_5 auf Malztrockensubstanz = **77,27**% der Gesamtphosphorsäure des Malzes.

2. Die Erdalkalienphosphorsäure durch Ammoniak gefällt. 0,229% P_2O_5 auf lufttrockenes Malz, 0,239% P_2O_5 auf Malztrockensubstanz = **31,63**% d gesamtlösl. Phosphorsäure = **24,44**% d. Gesamtphosphorsäure des Malzes.

3. Die Alkalienphosphorsäure im Filtrat der Ammoniakfällung mit Magnesiamixtur abgeschieden.
0,351 % P_2O_5 auf lufttrockenes Malz, 0,336 % P_2O_5 auf Malztrockensubstanz = **48,48** % d gesamtlösl. Phosphorsäure = **37,46** % d. Gesamtphosphorsäure des Malzes.

4. Die gesamtanorganische Phosphorsäure durch Addition ermittelt.
0,580 % P_2O_5 auf lufttrockenes Malz, 0,605 % P_2O_5 auf Malztrockensubstanz = **80,11** % d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **61,90** % d. Gesamtphosphorsäure des Malzes.

5. Die lösliche organische Phosphorsäure ergibt durch Berechnung
0,144 % P_2O_5 auf lufttrockenes Malz, 0,150 % P_2O_5 auf Malztrockensubstanz = **19,89** % d. gesamtlösl Phosphorsäure = **15,37** % d. Gesamtphosphorsäure des Malzes.

Durch das Maischen geht also nicht mehr Phosphorsäure in Lösung als bei der kalten wässrigen Extraktion. Man kann hier deshalb von keiner Verstärkung der enzymatischen Prozesse sprechen, sondern nur von einer Beschleunigung. Auch dadurch bestätigen wir die Angaben von Weiss und die von Windisch-Vogelsang insoweit, als sie die Maischversuche aus im Laboratorium hergestelltem Malz betreffen.

Zusammenstellung und Ergebnisse.

Die aus obigen Malzextrakten erhaltenen Resultate bringt diese Tabelle.

Extraktion	ges. lösl. P_2O_5	Erdalkal.-P_2O_5	Alkalien-P_2O_5	lösl. org. P_2O_5
Mit Wasser	77,27 %	36,07 %	33,62 %	7,58 %
Nach dem Maischeverfahren	77,27 %	24,44 %	37,46 %	15,37 %
Nach Windisch-Vogelsang	58,91 %	17,29 %	3,20 %	38,42 %
Nach 6-stündiger Alkoholkochung	42,26 %	21,45 %	14,30 %	6,51 %

Die Zahlen verstehen sich auf Prozente der Gesamtphosphorsäure.

Das Malz enthält neben Alkalien- auch noch Erdalkalienphosphorsäure.

Bei der wässrigen Extraktion sowie beim Maischeverfahren bewirken enzymatische Spaltungen eine Zunahme der anorganischen und gesamtlöslichen Phosphate durch Hydrolyse organischer Komplexe. Auch hier ist es die HCl-Extraktion, welche den kleinsten Wert für Alkalienphosphate ergibt und deshalb als wirksamstes Mittel zur Tötung der Fermente angesehen werden muss. Doch ist diese Methode beim Malz aus denselben Gründen nicht anwendbar wie bei der Gerste. Es empfiehlt sich am meisten die Auszüge nach 6-stündiger Behandlung des Materials mit Alkohol anzusetzen.

Malz und Gerste haben einen nennenswerten Gehalt an Phytin aufzuweisen, das seinen Sitz aber nur in den Spelzen hat.

III. Die Phosphorsäureverhältnisse in den Wurzelkeimen.

Auch die Wurzelkeime wurden auf die Natur ihrer Phosphate untersucht. Man verwendete dazu das Material, wie es beim Darren des Grünmalzes abfällt. Es wurde auf der Dreefsschen Mühle so fein als möglich gemahlen und die Auszüge in einem Verhältnis von 1 : 20 angesetzt, da die Malzkeime ein ausserordentlich starkes Quellungsvermögen besitzen und an und für sich mehr Phosphate enthalten. Die Untersuchung der Keime ergab folgende Werte.

Malzkeimanalyse.

Wassergehalt: 3,57 %.

Aschegehalt: 6,17 % auf lufttrockene Keime, 6,39 % auf Keimtrockensubstanz.

Phosphorsäuregehalt: 1,748 % auf lufttrockene Keime, 1,812 % auf Keimtrockensubstanz, 28,34 % auf die Asche der Keime.

1. Wässrige Extraktion.

20 g des gemahlenen Materials extrahierte man mit 400 cc Wasser 18 Stunden bei Zimmertemperatur. Man filtrierte ab und analysierte die Lösung nach den üblichen Methoden. Sie hatte einen intensiven Geruch nach Gurken. Der Amoniakniederschlag war rein kristallinisch.

1. Die gesamtlösliche Phosphorsäure durch Veraschung bestimmt. 1,680 % P_2O_5 auf lufttrockene Keime, 1,742 % P_2O_5 auf Keimtrockensubstanz = **96,11** % der Gesamtphosphorsäure der Keime.

2. Die Erdalkalienphosphorsäure durch Ammoniak gefällt. 0,476 % P_2O_5 auf lufttrockene Keime, 0,494 % P_2O_5 auf Keimtrockensubstanz = **28,33** % d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **27,23** % d. Gesamtphosphorsäure der Keime.

3. Die Alkalienphosphorsäure durch Magnesiamixtur im Filtrat der Ammoniakfällung abgeschieden. 1,140 % P_2O_5 auf lufttrockene Keime, 1,182 % P_2O_5 auf Keimtrockensubstanz = **67,86** % d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **65,22** % d. Gesamtphosphorsäure der Keime.

4. Die gesamtanorganische Phosphorsäure ergibt durch Addition 1,616 % P_2O_5 auf lufttrockene Keime, 1,676 % P_2O_5 auf Keimtrockensubstanz = **96,19** % d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **92,45** % d. Gesamtphosphorsäure der Keime.

5. Die lösliche organische Phosphorsäure ergibt durch Berechnung 0,064 % P_2O_5 auf lufttrockene Keime, 0,066 % P_2O_5 auf Keimtrockensubstanz = **3,81** % d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **3,56** % d. Gesamtphosphorsäure der Keime.

Von der grossen Phosphatmenge der Wurzelkeime geht fast alles in Lösung und zwar in anorganischer Form. Nur ein verschwindend kleiner Teil ist organisch gebunden. Dies war auch zu erwarten in Anbetracht dessen, dass wir in den Malzkeimen ein Material vor uns haben, welches sich in einem lebhaften Stadium des Wachstums befindet. Eine gewisse Quantität der anorganischen Phosphorsäure wird auch durch Enzyme aus organischen Verbindungen freigemacht, was sich aus den beiden nächsten Versuchen ergibt.

2. Extraktion mit 1 % konz. HCl-Lösung.

20 g unserer Substanz extrahierte man mit 400 cc einer HCl, welche 1 % konz. HCl-Lösung enthielt, 18 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur. Der Geruch nach frischen Gurken war verschwunden. Dafür war ein ausgesprochen

brotiger Geruch wahrnehmbar. Der Ammoniakniederschlag war fast rein kristallinisch, so dass also von einem Phytingehalt der Malzkeime nicht die Rede sein kann. Deshalb ist diese Extraktionsmethode hier auch anwendbar.

1. Die gesamtlösliche Phosphorsäure durch Veraschung bestimmt. 1,216% P_2O_5 auf lufttrockene Keime, 1,261% P_2O_5 auf Keimtrockensubstanz = **69,57%** der Gesamtphosphorsäure der Keime.

2. Die Erdalkalienphosphorsäure durch Ammoniak gefällt. 0,540% P_2O_5 auf lufttrockene Keime, 0,560% P_2O_5 auf Keimtrockensubstanz = **44,41%** d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **30,89%** d. Gesamtphosphorsäure der Keime.

3. Die Alkalienphosphorsäure durch Magnesiamixtur im Filtrat der Ammoniakfällung abgeschieden. 0,476% P_2O_5 auf lufttrockene Keime, 0,494% P_2O_5 auf Keimtrockensubstanz = **39,15%** d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **27,23%** d. Gesamtphosphorsäure der Keime.

4. Die gesamtanorganische Phosphorsäure ergibt durch Addition 1,016% P_2O_5 auf lufttrockene Keime, 1,054% P_2O_5 auf Keimtrockensubstanz = **83,56%** d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **58,12%** d. Gesamtphosphorsäure der Keime.

5. Die lösliche organische Phosphorsäure ergibt durch Berechnung 0,200% P_2O_5 auf lufttrockene Keime, 0,207% P_2O_5 auf Keimtrockensubstanz = **16,44%** d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **11,45%** d. Gesamtphosphorsäure der Gerste

Bei der enzymfreien Extraktion nimmt die gesamtlösliche Phosphorsäure um fast 30% ab. Doch überragt der Gehalt an anorganischen Phosphaten auch jetzt noch stark den bei Gerste und Malz.

3. Extraktion nach 6-stündiger Behandlung mit Alkohol.

20 g der gemahlenen Malzkeime behandelte man 6 Stunden bei Siedehitze mit 96%igem Alkohol, trocknete bei 105° und extrahierte mit 400 cc Wasser 18 Stunden bei Zimmertemperatur.

1. Die gesamtlösliche Phosphorsäure durch Veraschung bestimmt. 1,272% P_2O_5 auf lufttrockene Keime, 1,319% P_2O_5 auf Keimtrockensubstanz = **72,77%** der Gesamtphosphorsäure der Keime.

2. Die Erdalkalienphosphorsäure durch Ammoniak gefällt. 0,452% P_2O_5 auf lufttrockene Keime, 0,469% P_2O_5 auf Keimtrockensubstanz = **35,53%** d. gesamtlösl Phosphorsäure = **25,86%** d. Gesamtphosphorsäure der Keime.

3. Die Alkalienphosphorsäure durch Magnesiamixtur im Filtrat der Ammoniakfällung abgeschieden. 0,638% P_2O_5 auf lufttrockene Keime, 0,672% P_2O_5 auf Keimtrockensubstanz = **50,94%** d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **37,07%** d. Gesamtphosphorsäure der Keime.

4. Die gesamtanorganische Phosphorsäure ergibt durch Addition 1,100% P_2O_5 auf lufttrockene Keime, 1,141% P_2O_5 auf Keimtrockensubstanz = **86,47%** d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **62,93%** d. Gesamtphosphorsäure der Keime.

5. Die lösliche organische Phosphorsäure ergibt durch Berechnung 0,172% P_2O_5 auf lufttrockene Keime, 0,178% P_2O_5 auf Keimtrockensubstanz = **13,53%** d. gesamtlösl. Phosphorsäure = **9,84%** d. Gesamtphosphorsäure der Keime.

Zusammenstellung und Ergebnisse.

Die bei der Untersuchung der Wurzelkeime erhaltenen Resultate sind in folgender Tabelle vereinigt.

Die Werte verstehen sich auf Prozente der Gesamtphosphorsäure.

Extraktion	ges lösl. P_2O_5	Erdalkal.-P_2O_5	Alkalien-P_2O_5	lösl. org. P_2O_5
Mit Wasser	96,11 %	27,23 %	65,22 %	3,56 %
Mit 1 % HCl-Lösung	69,57 %	30,89 %	27,23 %	11,45 %
Nach 6-stündiger Alkoholkochung	72,77 %	25,86 %	37,07 %	9,84 %

Die Malzkeime erhalten wie das Malz selbst neben Alkalien- auch noch Erdalkalienphosphorsäure und zwar beide in grösserer Menge. Überhaupt überragt die gesamtlösliche Phosphorsäure der Wurzelkeime bei weitem die der Gerste und auch des Malzes. Am auffallendsten tritt dies bei der wässrigen Extraktion zu Tage, wo unter Mithilfe der fermentativen Hydrolyse fast sämtliche Phosphate in Lösung gehen zum allergrössten Teil in anorganischer Form.

Zusammenfassung sämtlicher Resultate.

Vorliegende Arbeit lieferte folgende Ergebnisse.

I. Von den Phosphaten des Bieres sind ca. 80 % in anorganischer Bindung vorhanden. Sie lassen sich durch Magnesiumixtur oder Uranlösung unter geeigneten Bedingungen abscheiden. Der Rest muss organischer Natur sein.

II. Die anorganischen Phosphorsäuren des Bieres sind teils an Erdalkalien teils an Alkalien gebunden. Man trennt sie durch separate Fällung mit Ammoniak und Magnesiamixtur.

III. Von den organischen Phosphaten sind die eine Hälfte wahrscheinlich Eiweiss- die andere Kohlehydratverbindungen. Sie lassen sich durch Säuern bei höherem Druck quantitativ zerlegen.

IV. Lecithin und Phytin konnten im Bier nicht nachgewiesen werden.

V. Bei der Gärung in phosphorsäurefreien Zuckerlösungen stirbt ein grosser Teil (60 %) der Hefezellen ab, deren Phosphor der lebenden Hefe als Nahrung dient. Dabei geht auch eine gewisse Menge organischer Phosphate in die Lösung über, welche als Stoffwechselprodukte der Hefe anzusehen sind.

VI. Bei der Gärung in Nährlösungen, welche anorganische Phosphate enthalten, bilden sich auf dieselbe Weise organische Phosphorverbindungen.

VII. Auch in der technischen Würze finden sich organische Phosphate in einer etwas geringeren Menge als im Bier.

VIII. Im Verlaufe der Gärung nimmt die anorganische Phosphorsäure der Würze langsam und stetig ab. Nur diese wird von der Hefe verzehrt, während die organischen Phosphate sogar eine kleine Zunahme erfahren, wenn die Gärung bei 25° und mit einer relativ grossen Hefenmenge durchgeführt wird.

IX. Bei der wässrigen Extraktion von Gerste, Malz und Wurzelkeimen wird durch Fermente aus organischen Verbindungen anorganische Phosphorsäure in Freiheit gesetzt. In Lösung gehen bei Gerste und Malz ca. 65 %, bei Wurzelkeimen dagegen ca. 96 % der Gesamtphosphorsäure.

X. Die Anwendung von 1 % konz. HCl-Lösung zur Extraktion von Gerste und Malz ist zwar zur Vernichtung enzymatischer Wirkungen geeignet, aber nicht empfehlenswert, weil Phytin dadurch gelöst wird.

XI. Zur Enzymtötung empfiehlt sich am meisten ein 6-stündiges Kochen des Materials mit Alkohol am Rückflusskühler vorzunehmen. Die Einwirkungsdauer des Alkohols bei Weiss war zu kurz bemessen.

XII. In der Gerste konnte man mit Sicherheit eine gewisse Menge (20 % der Gesamtphosphorsäure) anorganischer Phosphate nachweisen und zwar ist sie an Alkalien gebunden.

XIII. Das Malz enthält etwas mehr anorganische Phosphorsäure (25 % der Gesamtphosphorsäure). Es findet sich hier neben Alkalien- auch Erdalkalienphosphorsäure.

XIV. Den grössten Gehalt an anorganischen Phosphaten haben die Wurzelkeime aufzuweisen (ca. 65 % der Gesamtphosphorsäure), offenbar weil sich dieses Organ in einem Stadium intensiven Wachstums befindet. Auch hier treffen wir Alkalien- und Erdalkalienphosphate.

XV. Durch Einmaischen geht beim Malz nicht mehr Phosphorsäure in Lösung als bei der wässerigen Extraktion. Es tritt also bloss eine Beschleunigung und keine Verstärkung der enzymatischen Prozesse ein.

XVI. Der Gehalt an wasserlöslichen organischen Phosphaten bei Gerste, Malz und Wurzelkeimen ist gering. Er beträgt nur wenige Prozente der Gesamtphosphorsäure.

XVII. Gerste und Malz enthalten Phytin, welches seinen Sitz nur in der Spelze hat. Malzkeime enthalten kein Phytin.